

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Pathomechanismus der IL-17/IL-22 Produktion im Rahmen des  
Ischämie-Reperfusionsschadens in einem Mausmodell der warmen  
Darmischämie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Minh Quân Nguyen**

**2019**



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Pathomechanismus der IL-17/IL-22 Produktion im Rahmen des  
Ischämie-Reperfusionsschadens in einem Mausmodell der warmen  
Darmschämie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Minh Quân Nguyen**

**2019**

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Miriam Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1	Der Darm als immunologisches Organ .....	7
1.2	Darmschämie als medizinische Herausforderung .....	8
1.2.1	Der Ischämie-Reperfusionsschaden.....	8
1.2.2	Ätiologie und Formen der Darmschämie .....	10
1.2.3	Diagnostik .....	10
1.2.4	Therapiemöglichkeiten .....	11
1.3	Die immunologische Rolle von Interleukin-17 und Interleukin-22 .....	12
1.3.1	Die ROR $\gamma$ t abhängigen Interleukine IL-17/IL-22 .....	13
1.3.2	Innate Lymphoid Cells.....	15
1.4	Fragestellung dieser Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>17</b>
2.1	Verbrauchsmaterialien .....	17
2.2	Chemikalien und Reagenzien .....	18
2.2.1	Allgemeine Reagenzien .....	18
2.2.2	Lösungen für die Lamina Propria Zellisolierung.....	19
2.3	Mäuseanästhetikum.....	19
2.4	Instrumente und OP-Besteck .....	20
2.5	Geräte .....	20
2.6	Programme.....	21
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1	Tiere und Tierhaltung.....	22
3.2	Mäuseanästhesie.....	22
3.3	Tiermodell und Gruppendesign.....	23
3.4	OP-Verfahren .....	24
3.4.1	IRI-OP.....	24
3.4.2	Sham-OP .....	25
3.5	Zellisolierung aus der Lamina Propria .....	26
3.5.1	Entnahme des Darmes .....	26
3.5.2	Gewinnung von Zellen aus der Lamina Propria.....	27
3.6	Durchflusszytometrie .....	28
3.6.1	FACS-Antikörper.....	29

3.6.2	Zellkultur und FACS-Färbung.....	30
3.7	Histologische Aufarbeitung .....	33
3.7.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	33
3.7.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	33
3.8	Lichtmikroskopische Auswertung .....	34
3.8.1	Histologie des Darmes .....	34
3.8.2	Chiu-Score.....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1	Warmes Darmischämiemodell induziert Darmschädigung .....	36
4.2	Charakterisierung der IL-17/IL-22 produzierenden Zellen im Darmischämiemodell...40	
4.2.1	IL-17A Produktion durch die T-Zell Linie .....	41
4.2.2	IL-17/IL-22 Produktion durch die Klasse der ILCs .....	42
4.3	Unterschiede im IRI Schaden hinsichtlich IL-17A/IL-22 Produktion .....	44
4.3.1	Geringerer IRI-Score und IL-17A in RAG1-/RORYt-KO-Mäusen bei geringerer IL-17A Produktion.....	45
4.3.2	Vermehrt IL-22 in RAG-1- sowie IFN $\gamma$ in RORYt-KO-Mäusen bei geringerem IRI-Score.....	47
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>49</b>
5.1	Das angewandte Darm-IRI-Modell und der Einsatz des Chiu-Scores .....	49
5.2	Ausgeprägte Ischämieresistenz des Ileums .....	50
5.3	Klassische Th-17 Zelle als Hauptproduzent von IL-17A im Darm-IRI Modell.....	52
5.4	ILC3-Beteiligung bei Darmischämie .....	53
5.5	Protektive Wirkung von IL-22 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens des Darmes.....	54
5.6	Fazit.....	55
5.7	Ausblick .....	56
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
	<b>Danksagung.....</b>	
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	

### Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielle Peptide
AMS	Arteria mesenterica superior
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
C57BL/6J	Maus: C57BL/6J
ddH <sub>2</sub> O	doppelpdestilliertes Wasser
DN	Doppeln negativ
DTT	DL-Tithiothreitol solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HBSS	„Hank’s Balanced Salt Solution“
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	„human leukocyte antigen“
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	Innate Lymphoid Cells
IFN	Interferon
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden („ischaemia reperfusion injury“)
LP	Lamina Propria
KO	Knockout
Lig.	Ligamentum
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OP	Operation
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pb	Pacific Blue

## Abkürzungen

---

PBS	„Phosphate-Buffered Saline“
PE	Phycoerythrin
RPMI	Spezielles Zellkulturmedium RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor



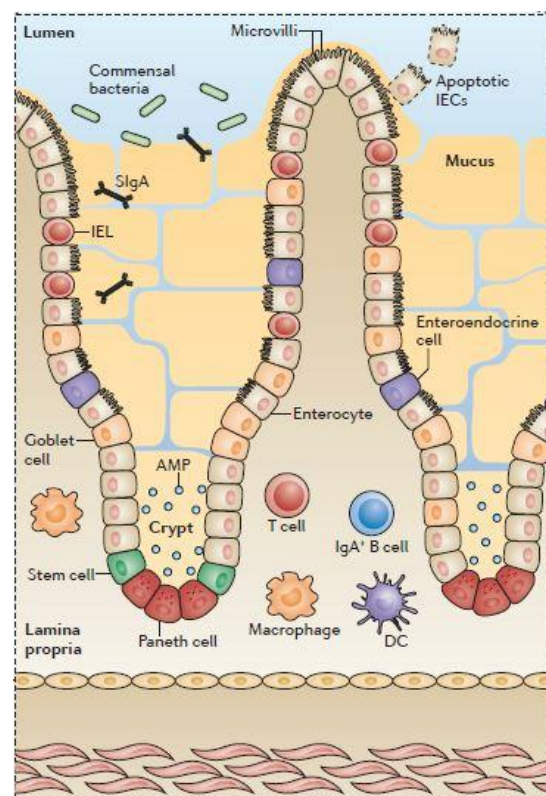
# 1 Einleitung

## 1.1 Der Darm als immunologisches Organ

Das Immunsystem des menschlichen Körpers ist wohl eines der meist erforschten Themengebiete der Medizin. Als Schutzmechanismus gegen gefährliche Umwelteinflüsse, Krankheitserreger oder Fehlfunktionen des eigenen Körpers ist das Immunsystem für das Überleben des Menschen unentbehrlich. Der Darm als eigenständiger Teil des Immunsystems ist dabei immer wieder ins Visier der Forschung gerückt. Mit seiner eigenen Bakterienflora und Kontakt zur Außenwelt, z.B. über die Nahrungsaufnahme, stellt er eine mögliche Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen dar. Hierbei spielen das sogenannte MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) und GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) eine besondere Rolle. Als teilweise selbstständig agierendes System passt sich der Darm den verschiedenen Umwelteinflüssen an und reguliert die Immunabwehr des Verdauungsapparates bis zu einem gewissen Punkt selbst.<sup>(1,2)</sup>

Als direkter Schutz vor pathogenen Eindringlingen sitzt über dem Darmepithel eine von Becherzellen und Enterozyten produzierte Schleimschicht. Diese ist mit antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. Defensinen oder auch Immunglobulin-A (IgA) Antikörper, ausgestattet, welche das Epithel nicht nur vor Gefahren schützen, sondern mitunter auch die Zusammensetzung der Darmflora beeinflussen. Zusätzlich dient die Schleimschicht als Nährstoffquelle und Milieu für das Mikrobiom des Darmes.<sup>(3)</sup>

Die Verteilung der Immunzellen im Darmgewebe weist hierfür Besonderheiten auf (siehe Abb. 1). Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) lassen sich, wie der Name schon sagt, im Epithel finden. Einige



**Abbildung 1: Übersicht Darmimmunologie;**  
Grafik aus *Nature Reviews Immunology*  
abgewandelt nach Mowat A.M. & Agace W.W.  
2014<sup>(1)</sup>

von ihnen besitzen direkten Kontakt zum Darmlumen, die anderen sitzen zwischen den Epithelzellen. Hier können die IEL die Erstantwort auf Pathogenkontakt mit Zytokin-, Chemokin- und AMP-Ausschüttung darstellen.<sup>(3)</sup> Der Hauptteil der intestinalen Immunzellen mit B-/T-Zellen, Makrophagen oder Dendritischen Zellen befindet sich hingegen in der *Lamina Propria*.<sup>(1)</sup> Das GALT, das darmspezifische lymphatische Gewebe, und die drainierenden Lymphknoten stellen die primären Stellen der erworbenen Immunantwort des Darmes dar. Subepitheliale Lymphozytenaggregate, Antigen-präsentierende Zellen und M-Zellen, welche Antigene aus dem Darmlumen für Lymphozyten einschleusen können, sind am Aufbau des GALT beteiligt. Makroskopisch ist das GALT an den sogenannten *Peyer Plaques*, Ansammlungen von Lymphfollikeln auf der Gegenseite des Mesenteriums, erkennbar.<sup>(1-4)</sup>

### 1.2 Darmischämie als medizinische Herausforderung

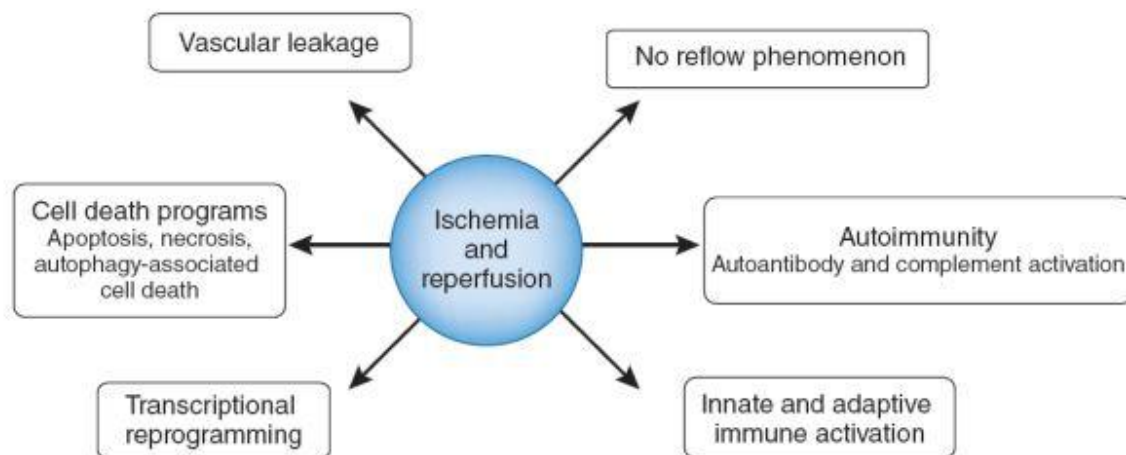
Die Darmischämie stellt ein häufiges und komplexes klinisches Problem dar. Sie ist mit hohen Komplikationsraten und schlechtem postoperativem Verlauf, mit einer durchschnittlichen Mortalität von 60%, verbunden.<sup>(5)</sup>

Bei einer akuten Mesenterialischämie (AMI) besteht ein hohes Risiko für einen tödlichen Verlauf. Dabei können die Ursachen für eine Darmischämie z.B. eine Arterienembolie oder Thrombose durchaus unterschiedlich sein, was schlussendlich aber immer in einer Minderversorgung mit Sauerstoff resultiert.<sup>(6)</sup>

#### 1.2.1 Der Ischämie-Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden oder kurz IRI besteht aus zwei sich einander beeinflussenden Phasen, welche aus der Minderperfusion des Gewebes und der entstehenden Hypoxie resultieren. Es entsteht einerseits ein durch die Ischämie bedingter Organschaden und andererseits ein diesem folgender Reperfusionsschaden, welcher auf inflammatorischen Prozessen des Immunsystems beruht. Hierbei wird auch zwischen "warmem" und "kaltem" IRI Schaden unterschieden. "Warm" definiert *in situ* entstehende Gewebeschäden, wobei "kalter" IRI Schaden ein Aussetzen der Mikrozirkulation nach z.B. einer Organentnahme und den damit verbundenen Problemen beschreibt.<sup>(7)</sup>

Aufgrund des metabolischen Stresses durch Hypoxie und Energiespeicherverbrauchs führt die Ischämie schließlich zum Absterben der Zellen durch Apoptose, Nekrose oder Autophagozytose, aber auch kürzlich entdeckte Zelltodmechanismen wie z.B. Nekroptose und Ferroptose.<sup>(7-9)</sup> Die Reaktion des Körpers auf die IRI zeigt dabei Ähnlichkeiten mit der Immunantwort auf eindringende Mikroorganismen, welche die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, wie z.B. CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-T-Zellen, oder auch Aktivierung des Komplementsystems umfasst.<sup>(7,10)</sup> Zusätzlich zur Immunreaktion des Körpers auf die IRI kann es auch zu mikrovaskulären Dysfunktionen kommen. Erhöhte Gefäßpermeabilität, Entzündung und Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden und -konstruktiven Faktoren können der Ischämie und Reperfusion folgen.<sup>(7,11)</sup> Dem durch die IRI entstehende Schaden folgt also eine Immunkaskade mit Ausschüttung verschiedener Zytokine, Chemokine oder auch Proteasen, die zusätzlich zu Inflammation und weiteren Gewebeschäden beitragen.<sup>(7,8,12)</sup>



**Abbildung 2: Biologische Prozesse im Rahmen von Ischämie und Reperfusion;** Grafik aus *Nature Medicine* nach Eltzschig HK & Eckle T. 2011<sup>(7)</sup>

Das Problem des Ischämie-Reperfusionsschadens ist bei vielen Ereignissen, welche ein Aussetzen des Blutflusses zur Folge haben, ein wichtiger Aspekt in der Therapie der Patienten, auch wenn dessen genaue Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

### 1.2.2 Ätiologie und Formen der Darmischämie

Die Blutversorgung des Darmes findet über den *Truncus Coeliacus*, die *Arteria mesenterica superior* (AMS), *Arteria mesenterica inferior* (AMI) und deren Kollateralen statt. Das Darmgewebe ist schon gegenüber kurzem Aussetzen des Blutflusses sehr empfindlich. Eine arterielle Embolie befindet sich meistens in der AMS aufgrund deren Größe und Verlauf.<sup>(13)</sup>

Eine akute arterielle Thrombose kann als Folge einer bereits existierenden Stenose mit chronischer Mesenterialischämie auftreten. Diese beiden Arten der Darmischämie sind klinisch ohne weiterführende Diagnostik nur schwer zu unterscheiden, was aber für die Therapie durchaus wichtig sein kann. Eine venöse Mesenterialthrombose lässt sich hingegen häufig auf Probleme der systemischen Koagulation, aber auch Entzündungsreaktionen durch z.B. Stresssituationen, wie Traumen oder größeren Operationen, zurückführen.<sup>(14)</sup>

### 1.2.3 Diagnostik

Zu den Risikofaktoren einer AMI gehören unter anderem kardiovaskuläre Krankheiten, wie z.B. kardiale Insuffizienz, Kammerflimmern, Bluthochdruck, das Alter oder vorangegangene Herz- und Gefäßoperationen. Die Patientengeschichte stellt somit einen wichtigen Punkt für eine zügige Diagnose dar.<sup>(15)</sup>

Bei der akuten Mesenterialischämie bestimmt eine rasche Diagnose über den weiteren klinischen Verlauf des Patienten. Daher ist es wichtig die AMI in der Diagnostik auch bei fehlenden Symptomen bei der klinischen Untersuchung im Hinterkopf zu behalten.<sup>(14)</sup> Starke Bauchschmerzen in Abwesenheit von anderen Symptomen, Diarrhöe, Erbrechen, Fieber, Fehlen von Darmgeräuschen bei der Auskultation und andere nicht-spezifische Marker können auf eine AMI hinweisen. Zur weiterführenden, absichernden Diagnostik eignen sich unter anderem Ultraschall, Angiographie, CT oder eine CT-Angiographie. Die Qualität in der Ultraschalluntersuchung variiert jedoch, wird negativ von einem Gas-gefüllten Darm beeinflusst und ist von der Erfahrung des Untersuchenden mit dem Ultraschallgerät abhängig. Ultima Ratio wird eine Diagnose bei Peritonitiszeichen auch durch eine Operation gestellt.<sup>(14)</sup>

### 1.2.4 Therapiemöglichkeiten

Bei einem Verdacht auf akute Mesenterialischämie sollte parallel zur laufenden Diagnostik die beginnende systemische Entzündungskaskade behandelt werden. Dafür sollten falls möglich Vasokonstriktiva abgesetzt, eine metabolische Azidose ausgeglichen und die Hämodynamik stabilisiert werden. Eine Antibiose wird routinemäßig zur Vorbeugung einer potentiellen Sepsis eingesetzt.<sup>(14)</sup> Die folgende Therapie wird an die höchstwahrscheinliche Diagnose des zugrundeliegenden Problems angepasst.

Um einen Ischämie-Reperfusionsschaden oder Darminfarkt an sich zu vermeiden wird bei einer mesenterialen Arterienembolie (MAE) eine schnellstmögliche Embolektomie angestrebt. Auch eine Translokation der AMS oder ein Bypass bieten mögliche Therapieoptionen.<sup>(14)</sup> Nekrotische Darmsegmente sollten während der OP reseziert werden. Es gilt dabei zu beachten nicht zu viel Darm zu entfernen um ein *short-bowel syndrome* zu vermeiden. Eine *second-look* Operation nach 24-48 Stunden, um Reste des nekrotischen Darmes zu resezieren und die Therapie zu reevaluierten, kann sinnvoll sein, ist bei Patienten mit wiederkehrenden Zeichen einer Peritonitis nach Erstoperation aber Pflicht.<sup>(13)</sup>

Eine Arterienthrombose, folgend auf eine Arteriosklerose, kann auch mit Translokation oder Bypass therapiert werden. Bei Patienten ohne Peritonitiszeichen kann unter anderem auf endovaskuläres Stenting zurückgegriffen werden.<sup>(16)</sup>

Auch kann eine direkte oder indirekte Thrombolyse indiziert sein.<sup>(14)</sup> Schlussendlich sind alle Therapieoptionen darauf ausgelegt so schnell wie möglich die Blutversorgung des Darmes wiederherzustellen.

Trotz der verschiedenen Therapiemöglichkeiten ist die Mortalität bei Patienten mit akuter Mesenterialischämie hoch.<sup>(14)</sup> Dies zeigt die klinische Notwendigkeit neuer Therapiemöglichkeiten der Darmischämie sowie ein besseres Verständnis für die Pathomechanismen.

### 1.3 Die immunologische Rolle von Interleukin-17 und Interleukin-22

Für ein tieferes Verständnis der IRI gilt es die immunologische Rolle der am Pathomechanismus der Darmischämie beteiligten Interleukine zu klären. Verschiedenste Ereignisse, wie z.B. Hypoxie/Reperfusion, physische oder immunologische Schäden, können zu einer Entzündungskaskade führen. In Abschnitt 1.2.1 bereits beschrieben kommt es beim Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer Vasodilatation, Einwandern von Entzündungszellen und einer Proliferation/Vermehrung von ansässigen Immun- sowie Gewebszellen, wobei eine Reihe von verschiedenen Entzündungsmediatoren wie freie Sauerstoffradikale, Zytokine, Eicosanoide oder auch Wachstumsfaktoren involviert sind (Abb. 3).

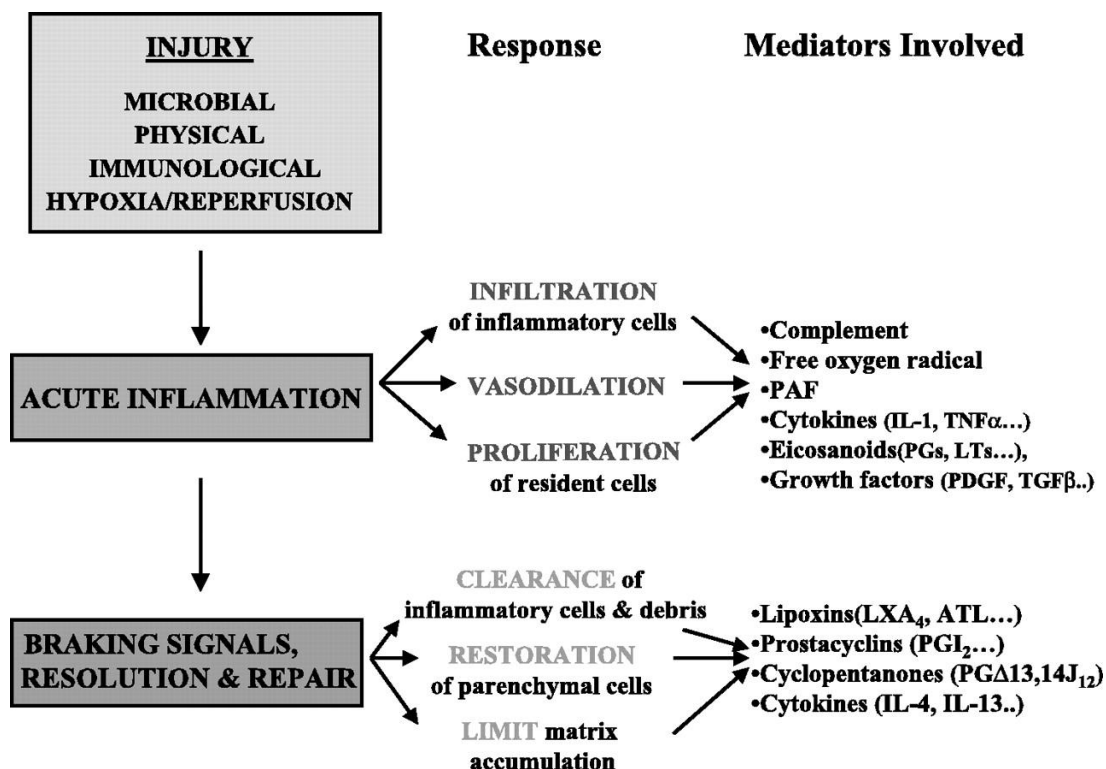


Abbildung 3: Schematisches Diagramm für die akute Entzündungsantwort; Grafik aus *American Journal of Physiology - Renal Physiology* nach McMahon B & Godson C 2004<sup>(11)</sup>

Diese Entzündungskaskade sollte normalerweise im Verlauf durch Wiederaufbau und Regeneration von Gewebe durchbrochen, sowie Entzündungszellen und zerstörtes Gewebe abgetragen werden. Falls dies nicht in ausreichendem Maße geschieht, entwickelt sich aus der akuten Entzündung eine chronische Entzündung mit rezidivierender und anhaltender Gewebsdestruktion.<sup>(7,11,17)</sup>

Eine Vielzahl an unterschiedlichen Mediatoren und Zellen spielen hierbei eine wichtige Rolle: C-reaktives Protein, Interleukin-6 (IL-6), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder auch Procalcitonin gehören zu den bekannteren Zytokinen.<sup>(17)</sup> Auch Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-22 (IL-22) wird eine Beteiligung in diversen inflammatorischen Prozessen zugeschrieben.<sup>(18)</sup>

### 1.3.1 Die RORyt abhängigen Interleukine IL-17/IL-22

RORyt gilt als essenzieller Regulator antimikrobieller Immunität und zentraler Bestandteil in entzündlichen Prozessen. Als Transkriptionsfaktor wird er unter anderem für IL-17 produzierende Zellen, wie z.B. der Th17-Zelle, sowie IL-22 produzierende *Innate Lymphoid Cells* der Klasse 3 (ILC3) benötigt. Zu den weiteren RORyt<sup>+</sup> Zellen zählen verschiedene T-Zell Untergruppen wie die bereits genannte Th17-Zelle, Natürliche Killer T-Zellen sowie die  $\gamma\delta$ -T-Zelle. Alle RORyt<sup>+</sup> Zellen können hierbei die Zytokine IL-17/IL-22 in unterschiedlich hoher Ausprägung exprimieren.<sup>(18–22)</sup>

#### 1.3.1.1 IL-17

IL-17 gilt als proinflammatorisches Zytokin in verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Rheuma, Psoriasis, Multiple Sklerose oder auch chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. IL-17 verbindet dabei unter anderem die angeborene und erworbene Immunabwehr. Neben pathologischen Wirkungen zeigt IL-17 auch positive Funktionen.<sup>(23)</sup>

Als Quellen für IL-17 gelten mitunter die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Subpopulation der Th17, die  $\gamma\delta$ -T-Zelle, Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zelle), Monozyten, Makrophagen sowie Dendritische Zellen: Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.<sup>(23–25)</sup>

Die Produktion von IL-17 wird unter anderem durch IL-6 sowie IL-23 stimuliert und löst nach seiner Freisetzung multiple Inflammationskaskaden aus. Dies kann zu chronischen und destruktiven Entzündungsreaktionen führen. IL-17, welches von Th17 Zellen produziert wird, führt unter anderem zu einer Rekrutierung der Granulozyten Zelllinie und Aktivierung von entzündungsfördernden Transkriptionsfaktoren in diversen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen oder Darmepithelzellen.<sup>(23)</sup>

Jedoch induzieren IL-17A und IL-17F in Kooperation mit IL-22, neben proinflammatorischen Funktionen, auch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), wie z.B. beta-Defensine, Mucine oder Chemokine, die zum Schutz von Gewebe beitragen.<sup>(26)</sup>

Zusätzlich wird IL-17 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens, besonders bei der Leberischämie, eine wichtige Rolle zugesprochen.<sup>(27–29)</sup> Auch im Darm-IRI Modell wurde IL-17 bereits nachgewiesen. Hier wurden bis jetzt vor allem Paneth-Zellen für die IL-17 Produktion verantwortlich gemacht.<sup>(30,31)</sup> In einer aktuellen Publikation von Geha *et al.* 2017 wurde die Rolle der Paneth-Zellen in der Darm-IRI hinterfragt und eine herausragende Rolle durch IL-17 produzierenden ILC3s postuliert.<sup>(32)</sup>

### 1.3.1.2 IL-22

Wie IL-17, zeigt auch IL-22 proinflammatorische Funktionen in Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematodes, Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose.<sup>(18)</sup> Die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Th17 Subpopulation, NK-Zellen sowie die  $\gamma\delta$ -T-Zelle sind bekannte IL-22 Produzenten. IL-17 und IL-22 besitzen demzufolge sehr ähnliche Quellen. Weiterhin gibt es noch die CD4<sup>+</sup> Th22 Subpopulation und die ILC3s.<sup>(33)</sup>

Als Hauptquelle von IL-22 werden die Th17-Zelle und ILC3s beschrieben, beides wichtige Zellpopulationen auch für IL-17.<sup>(18,33)</sup> Im Gegensatz zu IL-17 wird IL-22 eine wesentlich größere gewebeprotective Rolle zugesprochen. IL-22 induziert die Expression von epithelunterstützenden und -stärkenden Faktoren, es reguliert Mukus-assoziierte Proteine und ist notwendig für die Regeneration von schleimproduzierenden Becherzellen nach *dextransulfatsodium* (DSS) induziertem Epithelschäden.<sup>(34–36)</sup>

Folglich unterstützt IL-22 die Expression von antimikrobiellen sowie protektiven Genen und dient somit zum Schutz des Gewebes. Hierbei spielen die ILC3, welche sich in der *Lamina Propria* des Darmes finden lassen, eine besondere Rolle für die Darmintegrität, Homöostase des Mikrobioms und zum Schutz vor Pathogenen des Darmes (vgl. Abschnitt 1.3.2).<sup>(20,33,34)</sup>

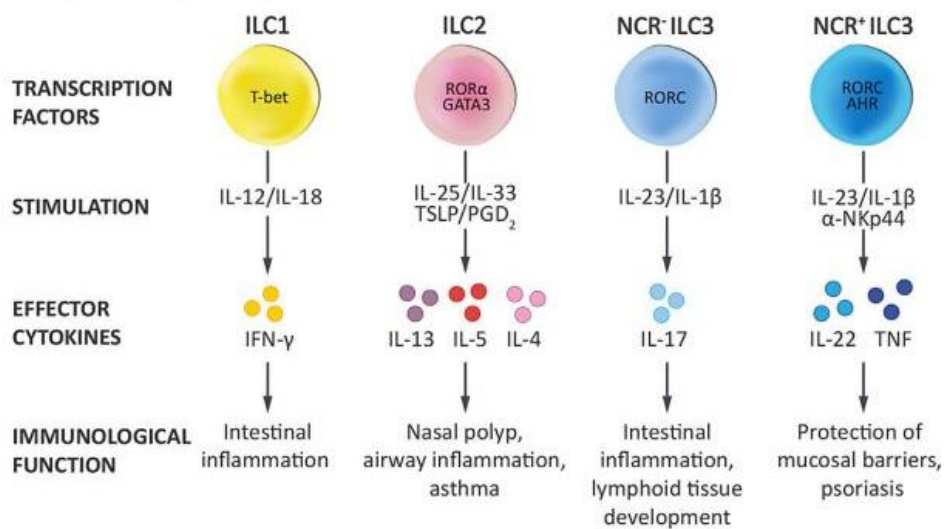


Beide Interleukine weisen infolgedessen jeweils pro- und antiinflammatorische Funktionen auf. Es ist bis jetzt noch nicht genau gezeigt worden, wie sich IL-17 und IL-22 gegenseitig beeinflussen, was aber letztendlich darüber entscheiden kann, ob sich eine größere Entzündungsreaktion mit Gewebeschäden ereignet oder nicht. Auch sind die genauen Pathomechanismen noch nicht hinreichend geklärt. IL-22 ist im Gegensatz zu IL-17 jedoch im Prozess des Ischämie-Reperfusionsschadens des Darmes bis jetzt noch nicht näher untersucht worden. In der Leber hingegen konnte bereits auf eine gewebeprotective Wirkung von IL-22 bei Ischämie hingewiesen werden.<sup>(28)</sup>

### 1.3.2 Innate Lymphoid Cells

*Innate Lymphoid Cells* (kurz ILCs) sind eine spezielle Gruppe von Immunzellen. Die verschiedenen ILC Populationen entstammen einer gemeinsamen lymphozytischen Vorgängerzelle (sog. *common lymphoid progenitor*, CLP) in der fetalen Leber oder dem erwachsenen Knochenmark.<sup>(37,38)</sup> Unterteilt werden ILCs anhand der Transkriptionsfaktoren für ihre Entwicklung und der sezernierten Zytokine in drei Gruppen. ILCs der Gruppe 1 stehen unter Kontrolle des T-bet Transkriptionsfaktor. ILC1 produzieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als Antwort auf intrazelluläre Pathogene. ILC2 sind ROR- $\alpha$  und GATA-3 abhängig und produzieren bei Anwesenheit von extrazellulären Parasiten Typ-2 Zytokine, wie z.B. IL-5, IL-9 und IL-13. Die Gruppe der ILC3 wird aus *Lymphoid Tissue inducer cells* (LTi) und ILC3 Zellen zusammengesetzt und sind vom Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t gesteuert.<sup>(38,39)</sup> Diese Zellen produzieren IL-17/IL-22 und lenken die Interaktion zwischen intestinalem Mikrobiom und Immunsystem.<sup>(25,36,37,40,41)</sup> ILCs, sowie deren Zytokine sind sowohl für Entzündungsprozesse, als auch für gewebeprotective Funktionen und Homöostase verantwortlich und sind damit wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Passend zu ihrer Rolle in der Immunüberwachung und Früherkennung von Pathogenen sind ILCs in Schleimhautoberflächen z.B. des Darmes, der Lunge und der Haut ansässig. Hier können sie schnell auf vom Epithel sezernierte Moleküle reagieren.<sup>(37,40–42)</sup>

### Konya and Mjösberg



**Abbildung 4: ILC Gruppen des Menschen.** Die Klassifikation der menschlichen ILCs anhand ihrer Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und produzierten Zytokine; Grafik aus *American Journal of Transplantation* nach Konya V & Mjösberg J. 2015<sup>(41)</sup>

Neben denen im vorherigen Abschnitt bereits beschriebenen Funktionen von IL-17/IL-22 zeigten insbesondere die IL-22 produzierenden ILC3 eine wichtige Beteiligung in der Prävention von intestinalem *Graft-versus-Host Disease* (GvHD) nach erfolgter allogener hämatopoetischer Zelltransplantation, wobei IL-22 hier eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung der epithelialen Zellintegrität zugesprochen wird.<sup>(41)</sup>

## 1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Diese Arbeit soll im Wesentlichen zur weiteren Aufklärung des Pathomechanismus der mesenterialen Ischämie beitragen. Dazu wird ein warmes murines mesenterial Ischämiemodell verwendet, welches über die beteiligten Immunzellen Aufschluss geben soll. Konkret werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ist das verwendete Mausmodell mit Abklemmung der AMS zur Klärung der Auswirkungen einer Darmischämie auf dessen Histologie geeignet?
2. Gibt es bei der Darmischämie einen Unterschied zwischen den Zellen des Jejunums und des Ileums?
3. Welche Zellen spielen eine zentrale Rolle für die IL-17-/IL-22-Produktion in der Dünndarmischämie?
4. Wie wird der Ischämie-Reperfusionsschaden durch IL-17/IL-22 im Darm-IRI Modell beeinflusst?

## 2 Material

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

10x PermeabilisationBuffer	eBioscience, USA
24-Well CellCultureCluster, Round Bottom Costar®	Corning Incorporated, USA
5ml Round Bottom Tube withCell-Strainer	Cap Falcon, USA
96-Well CellCultureCluster, Round Bottom Costar®	Corning Incorporated, USA
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
BD Mircrolance™ 3 Kanüle (0,3mm, 0,4mm, 0,9mm)	BD, Spanien
CellSmartStrainerZellsieb (70µl, 100µl)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Cellstar® Tubes 50ml	greiner, Frickenhausen
Cryomold intermediate (Kryo-Einbettform)	Sakura, Niederlande
Cryotubes	Corning Inc., USA
Deckgläser 24x40mm	Menzel, Saarbrücken
Einmal-Mikrohaematokrit-Kapillaren 32mm/9µl	Hirschmann, Eberstadt
Eppendorf Cups (1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Fettstift (Dako Pen®)	Dako, Dänemark
Filterpapier	Roth, Karlsruhe
Fixierpflaster	3M, Neuss
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Dänemark
gentleMACS C-Tubes	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Glaskapillare	Sarstedt, Nümbrecht
Kompressen	Hartmann, Heidenheim
Nahtmaterial (6.0 Polysorb)	Corning Inc., USA
Superfrost Ultra Plus® Menzelgläser (Objektträger)	ThermoFischer, Schwerte
Pipetten (2ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Nerbe Plus, Winsen (Luhe)
Serum Probengefäß 1,1ml Z-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (5ml, 10ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rothilabo®-Einbettkassetten für Biopsien	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek®	Sakura, Niederlande
Wattestäbchen	Hartmann, Heidenheim

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

### 2.2.1 Allgemeine Reagenzien

2,4-Dinitrophenylhydrazin	Sigma-Aldrich, USA
4,6-Diamidino-2phenylindoldihydrochlorid (Dapi)	Merck, Darmstadt
Acetic Acid (glacial) 100% anhydrous	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Atropinsulfat 0,5mg/ml	B. Braun, Melsungen
BD GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor	BD Bioscience, Heidelberg
BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor	BD Bioscience, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
DL-Dithiothreitol solution (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin G solution 0,5% aqueous	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%, 96%, 90%, 80%, 70%	Merck, Darmstadt
FACS-Antikörper (siehe 3.6.1)	eBioscience, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd <5%	Sigma-Aldrich, USA
Mayer's Hämalaun	VWR, Ismaning
HBSS w/ (with Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	ThermoFisher, Darmstadt
HBSS w/o (without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	ThermoFisher, Darmstadt
IC-Fixation Buffer	eBioscience
Ionomycin	Sigma-Aldrich, USA
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
L-Glutamin	ThermoFisher, Darmstadt
Lysepuffer	Qiagen, Hilden
Natriumchlorid 0,9%	Braun, Melsungen
P/S (Penicillin/Streptomycin)	ThermoFisher, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
PMA	Invivogen, USA
RMPI	ThermoFisher, Darmstadt
Roti® Clear	Roth, Karlsruhe
Trypanblau 0,5%	Sigma-Aldrich, USA

UltraPure™ 0,5M EDTA, ph 8.0	Invitrogen, USA
Xylazinhydrochlorid 2% (Xylazin)	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt
α-Ketoglutarat	Sigma-Aldrich, USA

### 2.2.2 Lösungen für die Lamina Propria Zellisolierung

Zur Zellisolierung aus der *Lamina Propria* wurde das "*Lamina Propria Dissociation Kit mouse*" der Firma MACS MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach eingesetzt.

Für dieses Kit sind folgende Lösungen am Vortag vorzubereiten:

➤ PB-Puffer	15ml/Tier	PBS + 0,5% BSA
➤ HBSS w/o (without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	20ml/Tier	
➤ <i>Digestion Solution</i>	2,35ml/Tier	HBSS w/ 3000µl FCS 5% 150µl + Enzyme
➤ <i>Predigestion Solution</i>	40ml/Tier	HBSS w/o 40ml 0,5M EDTA 400µl FCS 2000µl DTT 40µl

Das *Lamina Propria Dissociation Kit* enthält:

Enzyme D	100µl/Tier	pro gentleMACS C-Tube
Enzyme R	50µl/Tier	pro gentleMACS C-Tube
Enzyme A	12,5µl/Tier	pro gentleMACS C-Tube

### 2.3 Mäuseanästhetikum

Ketamin-Xylazin-Anästhetikum:	0,5 ml	NaCl 0,9%
	0,4 ml	Ketamin
	0,1 ml	Xylazin 2%
Atropin-Spritze:	0,9 ml	NaCl 0,9%
	0,1 ml	Atropinsulfat 0,5mg/ml

## 2.4 Instrumente und OP-Besteck

Aneurysma Clip-Anlegezange	Aeskulap, Tuttlingen
Aneurysma Clips (Yasargil 5,0mm)	Aeskulap, Tuttlingen
Dumont 7-Inox-H	Laborversand, Hartenstein
Dumont-Pro Nr. 5	Laborversand, Hartenstein
geschwungene Präzisionspinzette	Dumont, Schweiz
Färbekammer	Simport, Kanada
Laborpinsel im Satz	neoLab, Heidelberg
Nadelhalter	Aeskulap, Tuttlingen
Neubauer-Zählkammer	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzette, anatomisch	Aeskulap, Tuttlingen
Pinzette, chirurgisch	Aeskulap, Tuttlingen
Pinzette, stumpf rund	Aeskulap, Tuttlingen
Präparierschere	Aeskulap, Tuttlingen
Rasierer	Moser, Berlin
Wundspreizer	Moria, Frankreich

## 2.5 Geräte

Analysewaage (LC220)	Labor Center, Nürnberg
Durchlichtlampe (Power Supply 232)	EPLAX GmbH, Bremen
FACS Canto™2	BD, Spanien
Farbdigitalkamera für Mikroskop (Axio Cam ICc3)	Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe (HXP 120C)	Kübler, Jena
gentleMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
gentleMACS <i>Octo Dissociator with Heaters</i>	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Kaltlichtlampe (KL 2500 LCD)	Zeiss, Jena
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Zeiss, Jena
Mikrotom (CM 1900)	Leica, USA
OP Mikroskop	Zeiss, Jena
Photometer (Emax)	Molecular Devices, USA
Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Rüttler (Vortex-Genie2)	Scientific Industries, USA

Schwarzweiß Kamera Mikroskop (Axio Cam MRm)	Zeiss, Jena
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte (Thermal Pad, 712)	Shor-line, USA
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau

## 2.6 Programme

Acrobat Reader X	Adobe
Axio Vision Rel. 4.8	Zeiss
FlowJo 7.6.5	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 5 und 7	Thomson ResearchSoft.
Microsoft Excel 2007 und 2010	Microsoft Corp.
Microsoft PowerPoint 2007 und 2010	Microsoft Corp.
Microsoft Word 2007 und 2010	Microsoft Corp.

### 3 Methoden

#### 3.1 Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL6/6J (Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland), RAG1-*Knockout* Mäuse des Stammes B6.129S7 sowie RORyt-Knockout Mäuse eingesetzt (Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland). Diese wurden nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstiere (GV-SOLAS) unter Standardbedingungen im Tierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg gehalten. Alle durchgeführten Tierversuche (Genehmigungsnummer 55.2-2532, 1-33/14) erfolgten nach den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes und den Vorgaben des Tierversuchsantrages. Zum jeweiligen Versuch wogen die Tiere zwischen 20g und 30g und waren ca. 6-12 Wochen alt.

#### 3.2 Mäuseanästhesie

Zu Beginn eines Versuches wurde den Mäusen intraperitoneal mit einer 27 Gauge Nadel ihrem Gewicht spezifisch (siehe Tabelle 1) erst eine Atropin-Spritze, dann eine Ketamin/Xylazin Mischung verabreicht um eine ausreichende Schmerzfreiheit und Relaxation zu gewährleisten (vgl. Abschnitt 2.3 Mäuseanästhetikum). Eine für die Darm-IRI Operation ausreichende Narkosetiefe zeigte sich an der Bewegungslosigkeit und fehlenden Antwort auf einen Schmerzreiz.

**Tabelle 1: Gewichtsspezifische Mäuseanästhesie**

Gewicht	Applikationsmenge
17-20g	60µl
20-23g	70µl
23-27g	80µl
27-31g	90µl
31-40g	100µl



### 3.3 Tiermodell und Gruppendesign

Als Vorversuch wurden Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL6/6J operiert, um unterschiedliche Ischämie und Reperusionszeiten auf ihre Auswirkung auf den Darm zu untersuchen (siehe Tabelle 2). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, sodass für das Experimentdesign eine Ischämiezeit von 1 Stunde und eine Reperusionszeit von 15 Stunden etabliert wurde.

**Tabelle 2: Etablierungsversuch für das Experimentdesign**

<b>N</b>	<b>Ischämiezeit</b>	<b>Reperusionszeit</b>
5	60 Minuten	5 Stunden
5	60 Minuten	15 Stunden
5	45 Minuten	5 Stunden
5	45 Minuten	15 Stunden

Zur Untersuchung der Effektorzellen, welche den Ischämie-Reperfusionsschaden des Darmes bei AMS Abklemmung beeinflussen, wurden unterschiedliche Versuchsgruppen ausgewählt (siehe Tabelle 3).

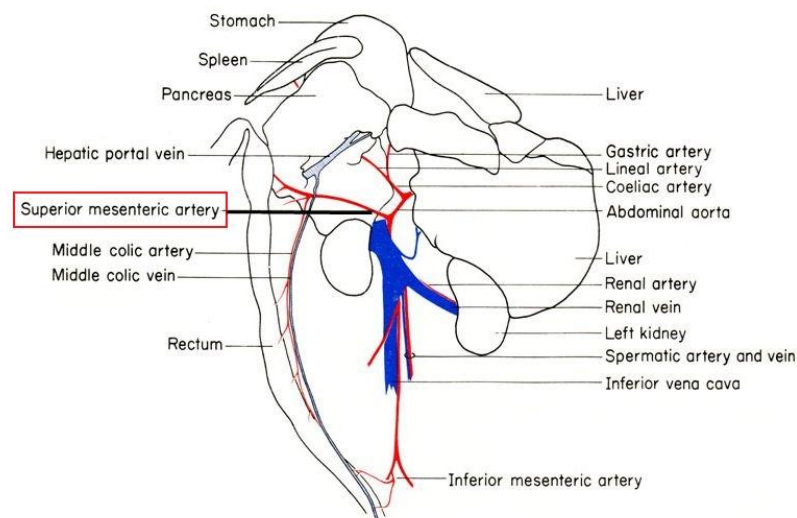
**Tabelle 3: Gruppen und Behandlung**

<b>Gruppe</b>	<b>Stamm</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Behandlung</b>
<b>1</b>	WT	15	IRI OP
<b>2</b>	WT	9	Sham OP
<b>3</b>	RAG1	10	IRI OP
<b>4</b>	RAG1	6	Sham OP
<b>5</b>	RORyt	6	IRI OP
<b>6</b>	RORyt	5	Sham OP

### 3.4 OP-Verfahren

#### 3.4.1 IRI-OP

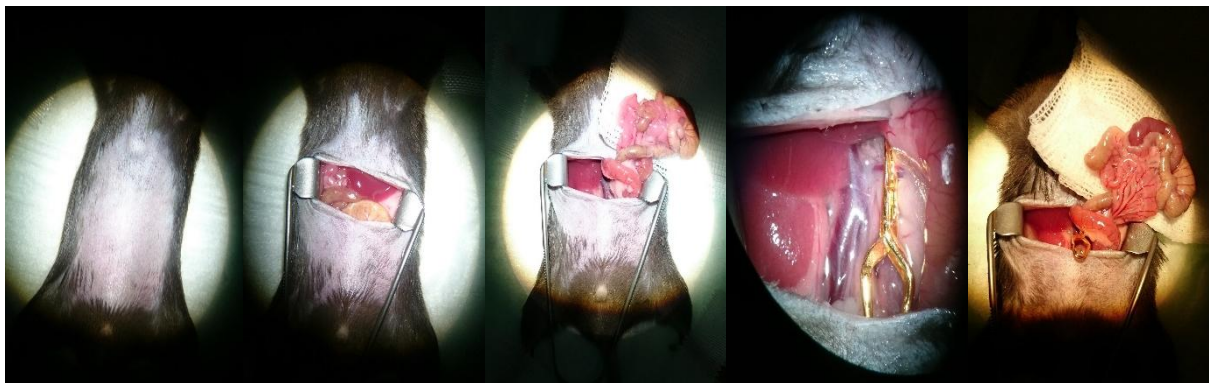
Für die Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens am Dünndarm wurde ein in der Literatur nicht einheitlich beschriebenes Verfahren mit Abklemmung der *A. mesenterica superior* nach dem Abgang aus der Bauchaorta (vgl. Abb. 5) verwendet, um eine 60-minütige warme Ischämie des Dünndarmes hervorzurufen.



**Abbildung 5: Schemazeichnung Äste der abdominalen Gefäßversorgung;** Grafik aus *The Anatomy of the Laboratory Mouse* nach Cook MJ 1980<sup>(43)</sup>

Nach Einwirken der Ketamin/Xylazin Anästhesie wird zunächst das Abdomen rasiert und mit einer Augensalbe das Austrocknen der Augen verhindert. Auf einer Wärmeplatte wird die Maus mithilfe von Pflasterstreifen an Armen und Beinen in Rücklage fixiert (Abb. 6, 1). Darauffolgend wird das Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert, mittels Längslaparatomie an der *Linea alba* eröffnet und unter Zuhilfenahme eines Wundspreizers der Bauchraum während der gesamten Operation offengehalten (Abb. 6, 2). Um ein Austrocknen der Bauchorgane zu verhindern, wird mit einer Spritze wiederholt mit physiologischer Natriumchloridlösung ohne Kanüle nachbefeuchtet. Um die Bauchgefäße darzustellen, werden mit NaCl-Lösung befeuchteten Wattestäbchen die Darmschlingen vorsichtig als Paket dem Bauchraum entnommen und auf einer Kompresse auf der Brust der Maus abgelegt (Abb. 6, 3). Bei freiem Blick auf die Gefäße wird die *A. mesenterica superior*, welche direkt unterhalb des *Truncus coeliacus* abgeht, mit krummer Pinzette und feuchtem Wattestäbchen aus dem

umliegenden Fettgewebe befreit und mobilisiert (vgl. Abb. 5). Vorsichtig werden mithilfe der geschwungenen Präzisionsspinzette nun Lymphgefäße ringsum der *A. mesenterica superior* abgelöst um ein Einklemmen dieser zu verhindern. Von Fett und Lymphgefäßen befreit wird nun mittels einer atraumatischen Aneurysma-Klammer die AMS für 60 Minuten abgeklemmt und eine warme Ischämie erzeugt (Abb. 6, 5+6). An den Darmschlingen kann dadurch eine relativ schnelle Entfärbung festgestellt werden, was das richtige Sitzen der Aneurysma Klammer bestätigt. Der Darm wird nun wieder ins Abdomen gelegt, die Maus für den Zeitraum der Ischämie auf der Wärmeplatte vor dem Auskühlen und mit einer befeuchteten Kompresse auf der Bauchdecke vor dem Austrocknen bewahrt. Nach 60-minütiger Ischämie wird die Klammer entfernt, wobei ein kräftiges Röten des Darmes beobachtet werden kann. Abschließend wird das Darmkonvolut als Paket wieder zurückgelegt und die Bauchdecke durch eine Faszien- und Hautnaht versorgt.



**Abbildung 6: IRI-Operation**

**Von links nach rechts:** 1. Fixierung in Rückenlage nach Bauchrasur, 2. Längslaparotomie und Spreizung des Abdomens, 3. Entnahme des Bauchkonvolutes, 4. + 5. Nahaufnahme der abgeklemmten *A. mesenterica superior* + Übersichtsaufnahme

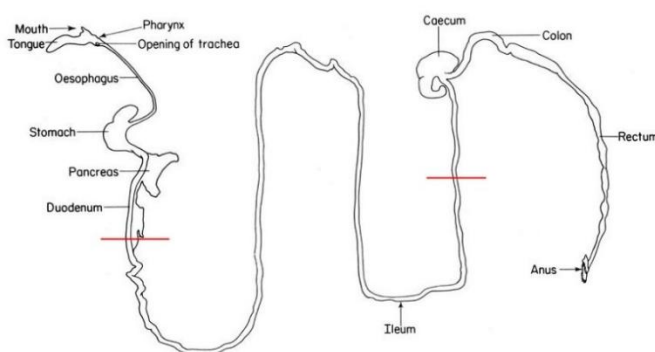
### 3.4.2 Sham-OP

Als Kontrolle zur Ermittlung des Ischämie-Reperfusionsschadens werden Sham-OPs durchgeführt, welche sich von der eigentlichen Darm-IRI OP nicht wesentlich unterscheiden. Hierbei wird nach Anästhesie, Augensalbe und Längslaparatomie das Darmkonvolut dem Bauchraum entnommen, aber keine Aneurysma Klammer an die AMS gesetzt. Nach etwa 5 Minuten wird der Darm wieder zurückgelegt und das Abdomen für eine Stunde mit einer feuchten Kompresse abgedeckt. Nach abgelaufener simulierter Ischämiezeit wird die Maus wie bei der normalen Darm-IRI Operation wieder zugenäht.

### 3.5 Zellisolierung aus der Lamina Propria

#### 3.5.1 Entnahme des Darmes

Nach 15 Stunden Reperfusionzeit werden die Tiere nach Serumgewinnung unter CO<sub>2</sub>-Narkose durch Genickbruch schnell und schonend getötet. Durch erneute Laparotomie entlang der Bauchnaht wird der Bauchraum wiedereröffnet und der Dünndarm vorsichtig herausgezogen. Dabei ist darauf zu achten, dass das Mesenterialgewebe von Fett, zu- und abführenden Gefäßen abgelöst wird. Der Darm wird hierbei 1-2cm nach dem Magen und 1-2cm vor dem *Caecum* mithilfe einer Schere abgetrennt. Der somit freiliegende Darmabschnitt kann nun in eine Petrischale mit kaltem PBS gelegt und mit einer Spritze kalten PBS durchspült werden um den Darminhalt zu entfernen. Alternativ kann auch zunächst mit der Pinzette der Darm vorsichtig ausgepresst und der restliche Darminhalt ausgespült werden (siehe Abb. 7).



**Abbildung 7: Entnahme des Darms zur weiteren Aufarbeitung**

**Links:** Schemazeichnung Magen-Darm-Trakt der Maus; Grafik aus *The Anatomy of the Laboratory mouse* nach Cook MJ 1980<sup>(43)</sup>.

**Rechts:** Ausspülen des Darminhalts mit PBS

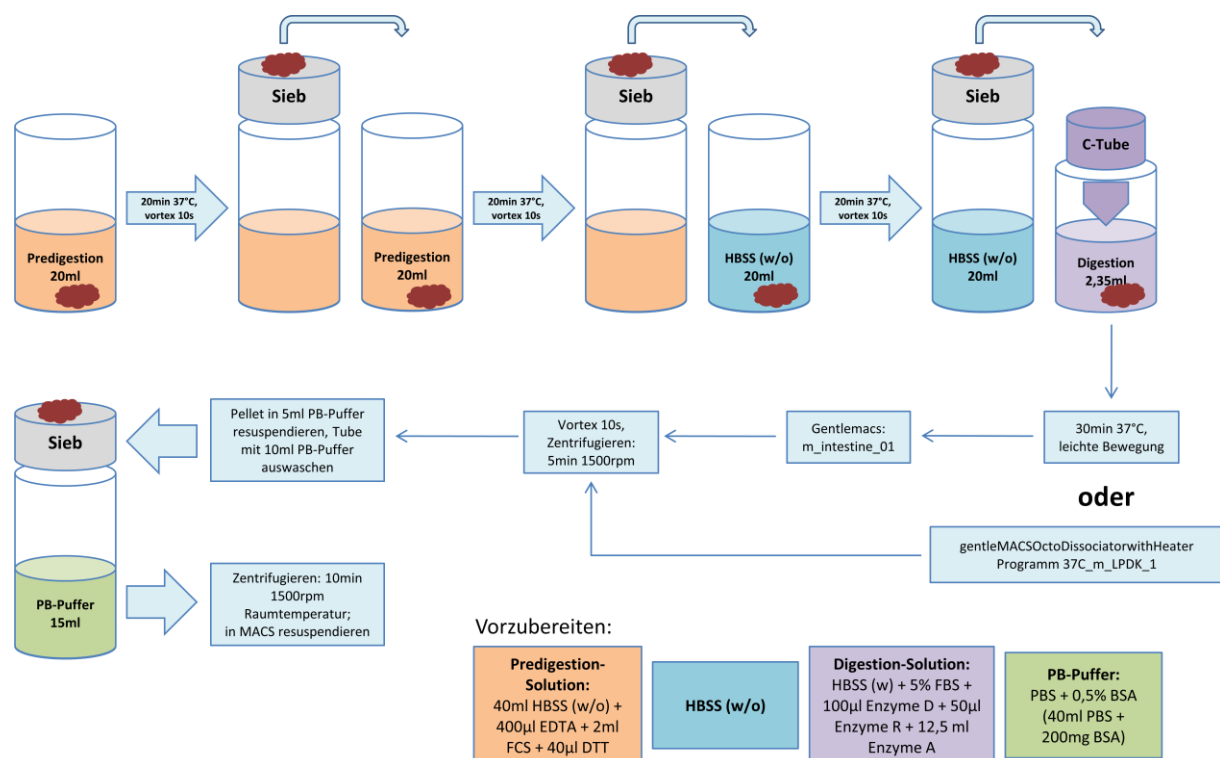
Für die histologische Auswertung des IRI-Versuchs werden jeweils zwei 0,5cm lange Abschnitte ca. 2cm nach dem Magen und vor dem *Caecum* herausgeschnitten. Dadurch erhält man zwei Jejunum und zwei Ileum Anteile, welche man für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung in einer Paraffineinbettkassette in einem Formaldehydgefäß und für andere Versuche in Tissue-Tek® in einer Kryoeinbettform bei -80°C lagert. Der klare Darm wird jetzt in einer frischen Petrischale mit kaltem PBS längs aufgeschnitten und durch schnelles hin und her bewegen des Gewebeschlauches die letzten Reste des Darminhaltes entfernt. Zum Schluss wird

der offene Darm in ca. 0,5cm lange Abschnitte geschnitten und in ein auf Eis gekühltes 50ml Tube mit 20ml Predigestion (in Abschnitt 2.1.6 beschrieben) überführt. Für einen späteren Schritt wird der Maus auch die Milz entnommen (siehe 3.6.2.2).

## 3.5.2 Gewinnung von Zellen aus der Lamina Propria

Folgende Lösungen sind vorzubereiten:

- 10xMACS
  - 27,5g BSA
  - 500ml PBS
  - 22ml 0,5M EDTA
- MACS
  - 52ml 10xMACS
  - 500ml PBS



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellisolation aus der Lamina Propria**  
 Zellisolation mittels "Lamina Propria Dissociation Kit mouse" der Firma MACS MiltenyiBiotec

Nachdem die Präparation aller Mäuse abgeschlossen ist, werden die Tubes mit der *Predigestion*-Lösung und den Darmstücken für um die 22 Minuten bei 37°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Proben sollen daraufhin für 10 Sekunden gut mit einem Vortexer durchgemischt und durch ein 100µm Sieb in ein neues Tube

gegeben werden. Das Gewebe wird in ein neues Tube mit 20ml *Predigestion* (siehe Abschnitt 2.2.2) überführt und wieder für 20 Minuten bei 37°C auf z.B. einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das Gewebe wieder filtriert und diesmal in einem 50ml Tube mit 20ml HBSS w/o bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Während die Proben für 20 Minuten inkubieren, werden auf gentleMACS C-Tubes 2,35ml *Digestion*-Lösung (in Abschnitt 2.2.2 beschrieben) verteilt und im Wärmeschrank bei 37°C vorgewärmt. Die Enzyme werden erst kurz vor Einsatz aufgetaut. Nach abgelaufener Inkubationszeit wird wieder für 10 Sekunden gevortext, das Darmgewebe durch ein 100µm Sieb. Die Enzyme werden nun wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben zu der *Digestion*-Lösung in die C-Tubes pipettiert und die Proben in das jeweilige C-Tube übertragen. Daraufhin werden die festverschlossenen C-Tubes unter leichter konstanter Bewegung bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, optional kann stattdessen mit der Heizfunktion des gentleMACS *Octo Dissociator with Heaters* das Programm *37C\_m\_LPDK\_1* durchlaufen werden. Falls erstere Methode angewendet wurde, müssen die C-Tubes nach der Inkubationszeit im gentleMACS noch das Programm *m\_intestine\_01* durchlaufen (siehe Abb. 8). Die C-Tubes werden daraufhin wieder gevortext und bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wird der Überstand vorsichtig abpipettiert, das Pellet mit den Zellen der *Lamina Propria* mit 5ml PB Puffer (in Abschnitt 2.2.2 beschrieben) resuspendiert und wieder durch ein 100µm Filter in ein neues 50ml Tube überführt. Das verbleibende leere C-Tube sollte sorgfältig mit weiteren 10ml PB-Puffer ausgewaschen, am besten nochmal mit dem PB-Puffer gevortext, und erneut durch den Filter gegeben werden. Zum Schluss werden die jeweiligen Tubes mit den Zellen der *Lamina Propria* nochmals für 10 Minuten bei 1500rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in MACS aufgenommen.

### 3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS) handelt es sich um ein Messverfahren, welches die Analyse von Zellen durch die Anwendung von elektrischer Spannung oder Lasern erlaubt. Hierbei werden Struktur, Form oder auch durch Färbung mit spezifischen Antikörpern die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe des FACS die Zellen des Darmes charakterisiert.

### 3.6.1 FACS-Antikörper

Für die FACS-Färbung wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller
CD3	FITC	eBioscience
CD4	FITC	eBioscience
CD8	FITC	eBioscience
CD19	FITC	eBioscience
B220	FITC	eBioscience
CD11b	FITC	eBioscience
CD11c	FITC	eBioscience
IL17A	FITC	eBioscience
NKp46	FITC	eBioscience
CD4	PE	eBioscience
CD8	PE	eBioscience
IL17a	PE	eBioscience
IL22	PE	eBioscience
CD127	PeCy7	eBioscience
CD8a	PeCy7	eBioscience
CD3	PeCy7	eBioscience
NKp46	PeCy7	eBioscience
CD4	APC	eBioscience
CD196/CCR6	APC	eBioscience
$\gamma\delta$ TCR	APC	eBioscience
NKp46	APC	eBioscience
CD117	APC-Cy7	eBioscience
CD3	APC-Cy7	eBioscience
CD24	APC-Cy7	eBioscience
CD27	APC-Cy7	eBioscience
IFNy	PB	eBioscience
IL17a	PB	eBioscience
CD4	PB	eBioscience
aqua	Aqua	Invitrogen

### 3.6.2 Zellkultur und FACS-Färbung

Folgende Lösung ist für die Zellkultur vorzubereiten:

➤ FullMedium	500ml RPMI
	50ml FCS
	5ml P/S
	5ml L-Glutamin

Aus den in MACS aufgenommenen Gewebeproben (siehe 3.5.2) werden jeweils 10µl entnommen und mit 90µl Trypanblau in eine 196-well-Platte pipettiert. Nach sorgfältigen auf- und abpipettieren werden 10µl des Gemisches entnommen und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Hiermit wird nach der Neubauer *improved* Methode unter einem einfachen Lichtmikroskop die Anzahl der Lymphozyten in den Zählquadranten ermittelt, um somit die gesamte Anzahl der Lymphozyten in den jeweiligen Tubes zu berechnen. Nach Ermitteln der Zellzahlen wird die gewünschte Anzahl in Kultur genommen. Hierfür wird zuerst der Kulturmastermix angesetzt, welcher für die spezifischen FACS-*Panels* (*Panel* mit oder ohne IL22) unterschiedlich ausfallen kann. Davon werden schließlich jeweils 100µl in der 24-well-Platte vorgelegt:

<u>nonIL22-Panels</u>		<u>IL22-Panels</u>	
FullMedium	100µl/well	FullMedium	100µl/well
golgiStop	0,73µl/well	golgiPlug	1,1µl/well
Ionomycin	0,55µl/well	Ionomycin	0,55µl/well
PMA	1µl/well	PMA	1µl/well

Zum Abschluss werden die Darmzellen pro FACS-*Panel* in je 1ml FullMedium aufgenommen, zum vorgelegten Mastermix der 24-well-Platte pipettiert und für 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert.



### 3.6.2.1 Probenfärbung

Folgende Lösungen sind für die FACS-Färbung vorzubereiten:

- Fix-Perm-Solution                      1x Fix-Perm-Concentrate + 3x Diluent
- wash-solution                            1x wash concentrate            + 9x ddH<sub>2</sub>O

Für die Oberflächenfärbung werden nach abgelaufener Inkubationszeit, in welcher der/die Mastermix(e) für die Färbung angesetzt worden ist/sind, mit einer 1000er Pipette die Wells sorgfältig auf- und abpipettiert und der Wellboden mit der Pipettenspitze abgekratzt, um möglichst alle Zellen in das FACS-Röhrchen zu überführen. Die FACS-Tubes werden nun bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand bei Bedarf in ein 1,5ml Cup pipettiert und bei -20°C weggefroren. Die Pellets auf den Tube-Böden werden im Anschluss mit 500µl MACS resuspendiert und für 5 Minuten bei 1500rpm 4°C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet mechanisch im Mediumrücklauf resuspendiert, was einem Waschschrift entspricht. Anschließend werden 100µl des jeweiligen Mastermix hinzugegeben, mit einem Vortexer vorsichtig durchmischt und für 15 Minuten bei 4°C und Dunkelheit im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin folgt ein weiterer Waschschrift mit 500µl MACS. Für nonIL22-Panels und IL22-Panels folgen jetzt unterschiedliche Schritte:

#### nonIL22-Panels

Nach Abkippen des Überstandes und Auflockern des Zellpellets werden den FACS-Tubes 500µl *Fix-Perm-Solution* hinzugefügt, das Röhrchen mithilfe eines Vortexer leicht durchmischt und bei 4°C unter Lichtschutz über Nacht gelagert.

#### IL22-Panels

Nach Abkippen des Überstandes und Auflockern des Zellpellets werden den FACS-Tubes jeweils 100µl *IC-Fixation-Buffer* hinzugefügt, mit dem Vortexer leicht durchmischt und im Dunkeln bei RT für 20 Minuten inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden 1000µl *wash-solution* in die Röhrchen pipettiert und ein Waschschrift durchlaufen. Zum Schluss werden die FACS-Röhrchen noch mit 1000µl wash-Solution nach Durchmischen bei 4°C unter Lichtschutz über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag folgt abschließend die Intrazelluläre Färbung. Die Proben vom Vortag durchlaufen einen Waschschrift mit 1000µl *wash-solution*. In der Zwischenzeit können der/die Mastermix(e) mit *wash-solution* angesetzt werden. Wieder werden 100µl Mastermix pro Zellpellet pipettiert, vorsichtig durchmischt und für 45 Minuten bei 4°C dunkel inkubiert. Schließlich folgt ein letzter Waschschrift mit 1000µl *wash-solution*. Die Proben werden zum Abschluss im nonIL22-Panel mit 500µl *wash-solution* und im IL22-Panel mit 300µl MACS aufgenommen und wieder bei 4°C bis zum Einsatz im Dunkeln gelagert.

### 3.6.2.2 Kompensation

Da bei Mehrfachfärbungen die einzelnen Farben auch in den Detektionsbereich anderer Farben interferieren können, müssen die Proben kompensiert werden. Hierfür werden Einzelfärbungen klassischer Lymphozyten benötigt, welche aus der Milz von B6 Wildtyp Mäusen gewonnen werden. Hierfür wird die Milz (siehe 3.5.1) mit einer Spritze und kleinen Kanüle perfundiert und mit PBS mehrmals über einem 100µl Sieb durchspült. Die fast farblose Milz wird nun auf dem Sieb sorgfältig zerdrückt, das Sieb mit PBS bis 50ml nochmal sauber durchgespült und das Tube dann für 5 Minuten bei 1500rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird danach dekantiert, das Pellet aufgelockert, 5ml Lysepuffer dazugegeben, gevortext und direkt wieder bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 30ml MACS resuspendiert und durch ein neues Zellsieb in ein neues 50ml Tube gegeben. Das alte Tube wird nochmal mit 20ml MACS nachgespült und durch das Sieb geschüttet. Das nun neue 50ml Tube wird wieder bei 1500rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet ein letztes Mal in 35ml MACS resuspendiert.

Für die Kompensation werden jeweils 1ml der Milzzellen auf 8 FACS-Röhrchen (für unsere 7 Farben + ungefärbte Kontrolle) verteilt und das gleiche FACS-Färbeprotokoll durchgearbeitet wie bei den Darmproben. Jedoch werden statt des Mastermix nur jeweils 1 Farbstoff pro Tube eingesetzt. Hierfür werden für die Einfachfarben (FITC, PE, APC, PB) CD4 und für die Farbkonjugate (PeCy7, APC-Cy7) die gleichen Marker eingesetzt wie im Probenpanel. Es müssen für jedes unterschiedliche Panel dem Puffer entsprechende Kompensationsproben angelegt werden (nonIL22/IL22).

## 3.7 Histologische Aufarbeitung

### 3.7.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Mithilfe eines Mikrotoms werden von den auf einer Kühlplatte abgelegten Paraffinblöcken (siehe 3.5.1) Schnitte mit einer Schichtdicke von 5µm erstellt und mit einem Pinsel in ein Wärmebad mit 46-49°C übertragen. Nach etwa 45-60 Sekunden werden die Schnitte auf entsprechende Objektträger aufgenommen und zusammen für mindestens 24 Stunden bei 37°C zum Austrocknen senkrecht gelagert.

### 3.7.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Das histologische *Scoring* des Darm-IRI wird anhand von HE-Färbungen durchgeführt. Eosinophile/azidophile Zellbestandteile wie Zellplasmaproteine werden dabei durch Eosin rot und basophile Zellbestandteile wie DNA im Zellkern durch Hämalaun blau angefärbt. So lassen sich unterschiedliche Zellstrukturen gut unterscheiden. Für die Färbung wird folgendes Protokoll angewendet:

Die getrockneten Paraffinschnitte aus 3.7.1 werden als erstes für 2x 10 Minuten in Roti® Clear deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe bei 2x 5 Minuten 100%, jeweils 1x 5 Minuten 90%, 80%, 70% Ethanol und 5 Minuten ddH<sub>2</sub>O rehydriert. Daraufhin bekommen die Schnitte bei 20 Sekunden Hämalaun ihre Kernfärbung (falls nötig länger). Das überschüssige Hämalaun wird mit zwei Schnellwaschschritten (schnelles Ein- und Auftauchen) in Leitungswasser entfernt und die Blaufärbung der Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser intensiviert (sog. Bläuen). Der nächste Schritt besteht aus 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O worauf die Zytoplasmafärbung bei 20 Sekunden Eosin + 0,5% *Acetic Acid* folgt. Wieder folgen zwei Schnellwaschschritte, diesmal in ddH<sub>2</sub>O, und darauffolgend 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O eingetaucht. Als Abschluss durchlaufen die Paraffinschnitte zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe mit 2x 5 Minuten 96%, 1x 5 Minuten 100% Ethanol und mindestens 10 Minuten Roti® Clear. Die Schnitte werden nun mit Deckglas und Entellan abgedeckt und zum Trocknen für 24 Stunden bei RT unter einem Abzug gelagert.

### 3.8 Lichtmikroskopische Auswertung

#### 3.8.1 Histologie des Darmes

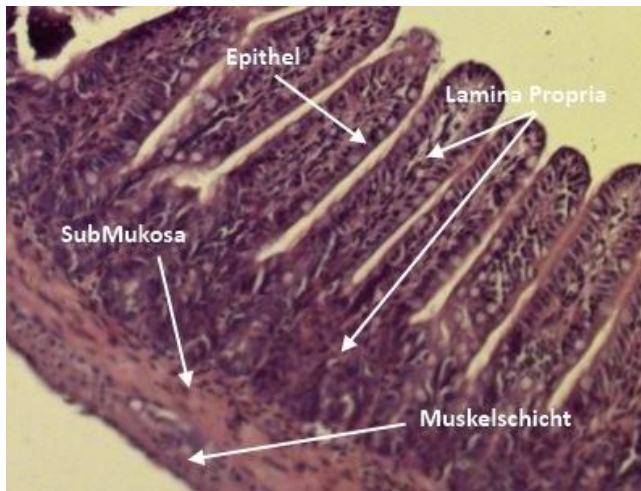


Abbildung 9: Histologisch HE-gefärbter Ausschnitt der Darmstruktur

Der Dünndarm lässt sich in drei Teile gliedern: Duodenum, Jejunum und Ileum, wobei die Blutversorgung hauptsächlich durch die *A. mesenterica superior* gewährleistet wird. Das Epithel bildet sich aus Enterozyten, intraepithelialen Lymphozyten, Becherzellen, Stammzellen, Paneth Zellen und enteroendokrinen Zellen. Gleich unter dem Epithel befindet sich die *Lamina*

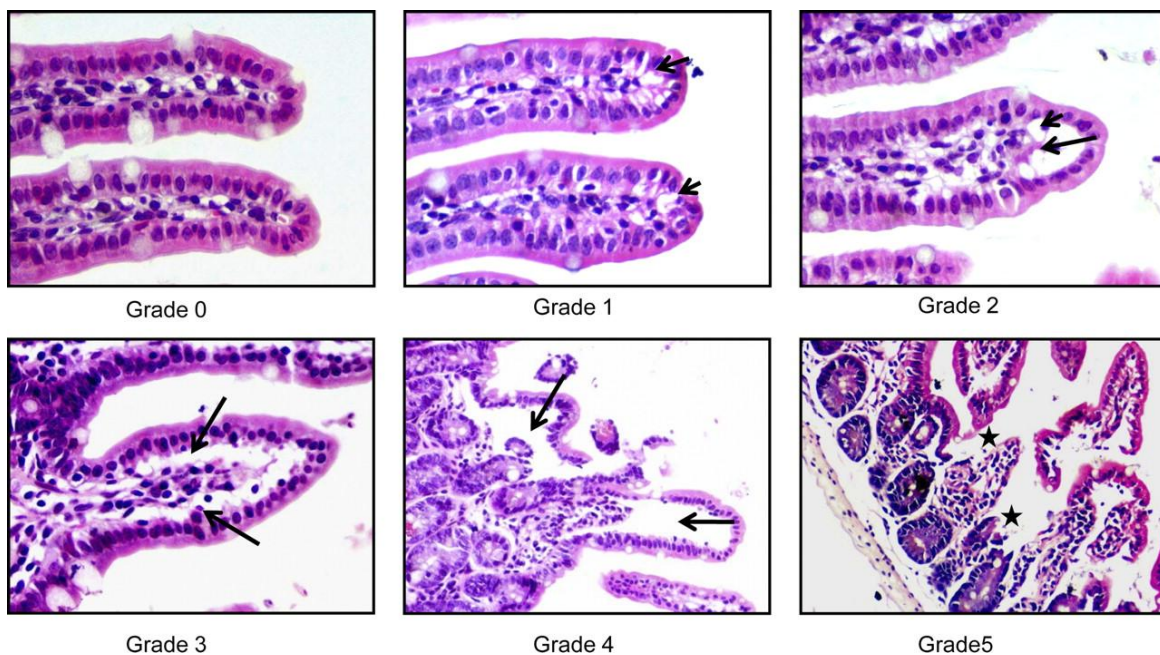
*Propria*, in welcher Kapillargefäße die Darmzotten durchziehen. Sie ähnelt dabei der Submukosa, aus welcher die Gefäße entspringen. Die Submukosa besteht bei Mäusen aus lockerem fibroelastischen Bindegewebe, welches zu- und abführende Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenplexi enthält. Den Abschluss bildet die Muskelschicht, welche sich aus zwei glatten Muskelschichten zusammensetzt. Die innere zirkuläre Schicht ist hierbei wie beim Menschen dicker als die äußere Längsmuskelschicht.<sup>(1–4)</sup>

#### 3.8.2 Chiu-Score

Um eine nachvollziehbare und einheitliche Bewertung der Auswirkungen der Darm-IRI Operation gewährleisten zu können, wird in dieser Arbeit der Chiu-Score, erstmals beschrieben von Chiu *et al.* 1970, für die histologische Auswertung genutzt.<sup>(44,45)</sup> Alle Präparate wurden unter gleichen Bedingungen, mit demselben Gerät mikroskopiert und nach den gleichen Kriterien ausgewertet. Der genutzte Chiu-Score wird in Tabelle 4 und Abbildung 11 folgend genauer erklärt.

**Tabelle 4: Chiu-Score, Klassifikation des mukosalen Schadens durch Ischämie** <sup>(44,45)</sup>

Grad	Charakteristik
0	Mukosa mit normalen Zotten
1	Entstehung von subepithelialen Gruenhagen's space, hauptsächlich an Zottenspitzen
2	Ausdehnung des Gruenhagen's space mit langsamer Ablösung des Epithels von der Lamina Propria
3	Massive Ablösung des Epithels entlang der Zottenseiten
4	Entblößte Zotten mit Lamina Propria und ausgedehnte Kapillaren
5	Ulzeration und Auflösung der Zottenstruktur und der Lamina Propria



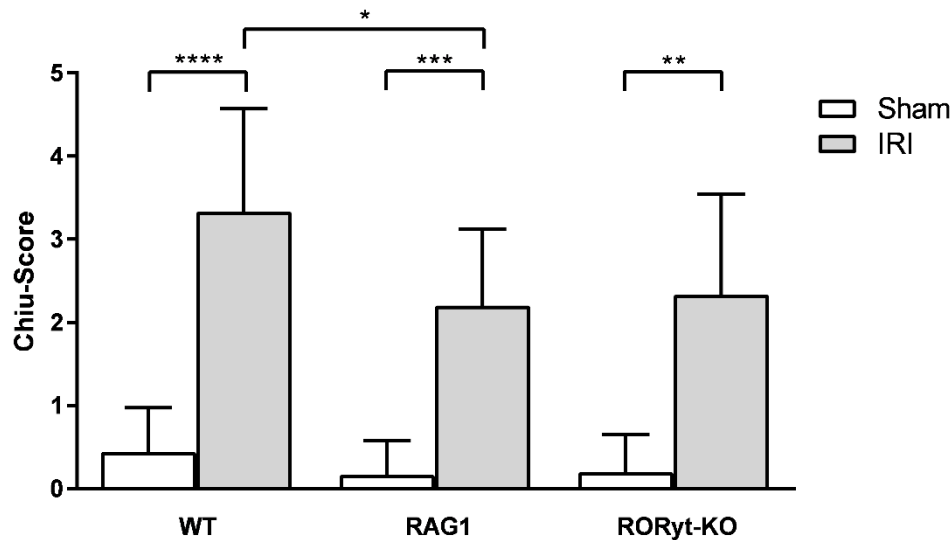
**Abbildung 10: Histologische Kriterien zur Graduierung des Zottenschadens;** Grafik aus *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* nach Rena Feinman et al. 2010<sup>(45)</sup>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Warmes Darmischämiemodell induziert Darmschädigung

Um die Auswirkungen und die Pathophysiologie der Darmischämie genauer untersuchen zu können, wurde ein Maus Modell angewendet, welches eine 60-minütige warme Ischämie des Dünndarmes durch Abklemmen der *A. mesenterica superior* umfasst. Ein umfassendes Operationsprotokoll ist bereits im Methodenteil in Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Nach Narkose, Rasur, Fixation, Längslaparotomie und Freilegen der *A. mesenterica superior* wird mithilfe einer atraumatischen Klammer die AMS für 60 Minuten abgeklemmt und somit eine warme Ischämie erzeugt (vgl. Abb. 6). Hierdurch wird ein Großteil der Blutzufuhr des Dünndarmes unterbunden, was makroskopisch an der raschen Entfärbung des Dünndarmes und Kaliberschwund der Gefäße zu erkennen ist. Die Reperfusion beginnt bei Öffnung der Klammer nach abgelaufener Ischämiezeit mit deutlicher Rotfärbung der Darmschlingen.

Anschließend wurde untersucht, ob durch Anwendung dieses Operationsprotokolles ein Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden kann. Unter Etablierung einer IRI- und einer Sham-Gruppe sollte geklärt werden, inwiefern es einen Unterschied der Resultate durch Operationsprozess mit und ohne Abklemmen der AMS gibt (vgl. Tiermodell und Gruppendesign im Abschnitt 3.3). Aufgrund des Fehlens von darmspezifischen klinischen Ischämieparametern wurde zur Erhebung des IRI-Schadens der erstmals von Chiu *et al.* 1970 beschriebene Chiu-Score zur histologischen Auswertung des Zottenschadens herangezogen.<sup>(44,45)</sup>

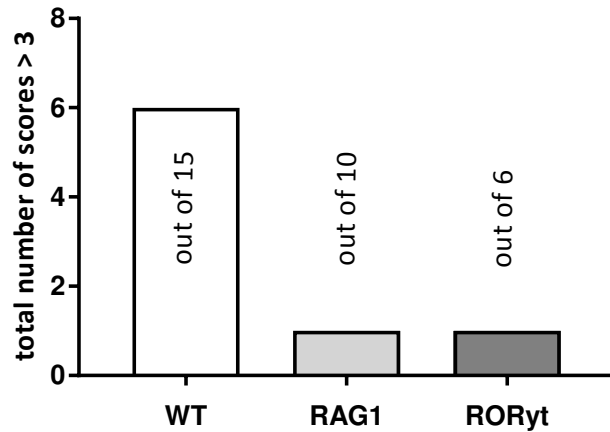


**Abbildung 11: Chiu-Score Auswertung im Jejunum**

Signifikant erhöhter Chiu-Score nach IRI-OP bei WT- (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), RAG1- (\*\*\*  $p = 0,0002$ ) sowie bei RORyt-KO-Mäusen (\*\*  $p = 0,0049$ ); zusätzlich signifikant höherer Chiu-Score bei WT-IRI-Mäusen im Vergleich zu RAG1-IRI-Mäusen (\*  $p = 0,011$ )

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Chiu-Score zwischen der IRI- und Sham-Gruppe im Jejunum des Wildtyp bei 60-minütiger Ischämie und 15-stündiger Reperfusion ( $p < 0,0001$ ). Es stehen sich ein durchschnittlicher Chiu-Score von 3,33 bei der IRI-Gruppe und einem Score von 0,44 bei der Sham-Gruppe gegenüber. Dieses Ergebnis lässt sich auch in der RAG1-Gruppe mit 2,2 zu 0,167 sowie in der RORyt-KO-Gruppe mit 2,33 zu 0,2 reproduzieren. Auch bei den RAG1-Mäusen ( $p = 0,0002$ ) sowie bei den RORyt-KO-Mäusen ( $p = 0,0049$ ) zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Chiu-Score zwischen IRI- und Sham-operierten Mäusen. Zusätzlich konnte ein signifikant höherer Chiu-Score bei den IRI-induzierten Wildtyp-Mäusen im Gegensatz zu den RAG1-Mäusen ermittelt werden ( $p = 0,0211$ ). Gegenüber der RORyt-KO-Gruppe war dies jedoch mit einem p-Wert von  $p = 0,1083$  nicht signifikant.

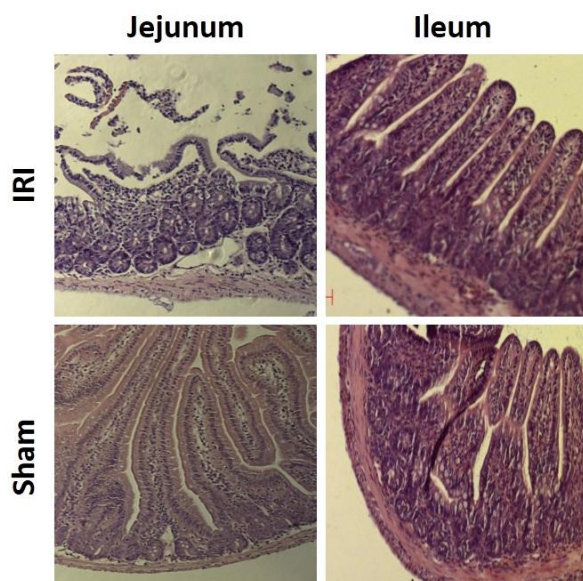




**Abbildung 12: Vergleich des Chiu-Scoring mit Werten > 3**

Anzahl an IRI-Tieren mit einem Chiu-Score > 3: WT: 6/15, RAG1: 1/10, RORyt 1/6

Auffällig ist jedoch, dass bei den RAG1- sowie RORyt-KO-Mäusen kein maximaler Schaden mit einem Chiu-Score von 5 und nur einmal einem Score von 4 bei zehn IRI-operierten Mäusen zu finden ist. Bei der Wildtyp-Gruppe hingegen lässt sich ein Wert über 3 häufiger dokumentieren (vgl. Abb. 12).

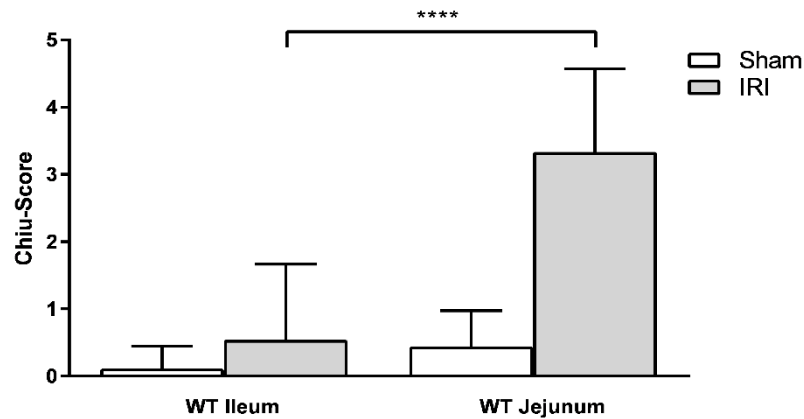


Im Gegensatz dazu lassen sich im Ileumanteil der Mäuse weder größere Schäden noch wirkliche Unterschiede zwischen IRI- und Sham-Gruppen nachweisen. Veranschaulicht in den Abbildungen 13 und 14 wurden jeweils in der IRI- und der Sham-Gruppe bei Wildtyp-Mäusen ein Jejunumstück und ein Ileumstück histologisch untersucht.

**Abbildung 13: Vergleich der Histologie bei Jejunum und Ileum**

Repräsentative Gegenüberstellung von HE-gefärbten histologischen Präparaten von IRI- sowie Sham-operierten Jejunum- und Ileumanteilen



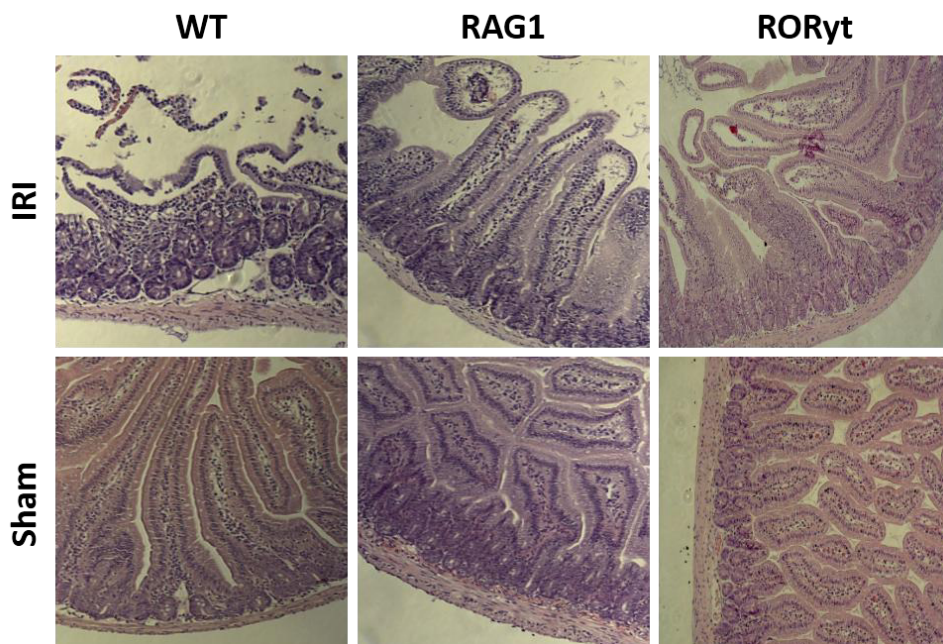


**Abbildung 14: Vergleich des Chiu-Score bei Jejunum und Ileum**

Chiu-Score Auswertung der histologischen Präparate mit signifikanter Erhöhung des Chiu-Score bei IRI-induzierten Jejunumanteilen gegenüber Ileumanteilen (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Es zeigte sich ein signifikant höherer Chiu-Score im Jejunum gegenüber dem Ileum ( $p < 0,0001$ ). Darüber hinaus lässt sich eine kaum ersichtliche IRI-induzierte Schädigung im Ileum gegenüber Sham-operierten Mäusen entnehmen ( $p = 0,2854$ ). Dort stehen sich ein durchschnittlicher Chiu-Score bei IRI-Ileum von 0,54 und 0,11 bei Sham-Ileum gegenüber (vgl. Abb. 14).

Histologisch wurde in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung somit ein durch Ischämie erzeugter Zottenschaden nachgewiesen, welcher sich durch Abhebungen sowie Ablösungen des Epithels, bis hin zu Ulzerationen und Auflösung der Zottenstruktur und der *Lamina Propria* manifestierte (vgl. Abb. 15).



**Abbildung 15: Repräsentative Gegenüberstellung von Dünndarmhistologie nach IRI-/Sham-OP**

Chiu-Scores: WT-IRI: 5; RAG1-IRI: 3; RORyt-IRI: 3; alle drei Sham-Tiere: 0

## 4.2 Charakterisierung der IL-17/IL-22 produzierenden Zellen im Darmischämiemodell

Durch den Nachweis eines durch das angewendete IRI-Operationsverfahren verursachten Ischämie-Reperfusionsschadens können nun mittels verschiedener Methoden die am IRI beteiligten Zellen und Zytokine näher charakterisiert werden. Aufgrund dessen wurde, wie im Abschnitt 3.3 bereits beschrieben, ein Gruppendesign mit Wildtyp, RAG1 und RORYt gewählt. Wildtyp-Mäuse sind genetisch unverändert. Zusätzlich wurden RAG1 Mäuse, welche keine T-Zell Bildung besitzen, sowie ein RORYt-*Knockout* Stamm ohne den Transkriptionsfaktor RORYt verwendet.<sup>(46)</sup>

Am vielversprechendsten und verlässlichsten zeigte sich zur Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen die durchflusszytometrische Auswertung. Hierfür wurden aus allen verwendeten FACS-Antikörpern (vgl. FACS-Antikörper in Abschnitt 3.6.1) nach zahlreichen Etablierungsversuchen letztendlich drei angepasste FACS-*Panel* angefertigt, welche bei den folgenden Versuchen eingesetzt wurden:

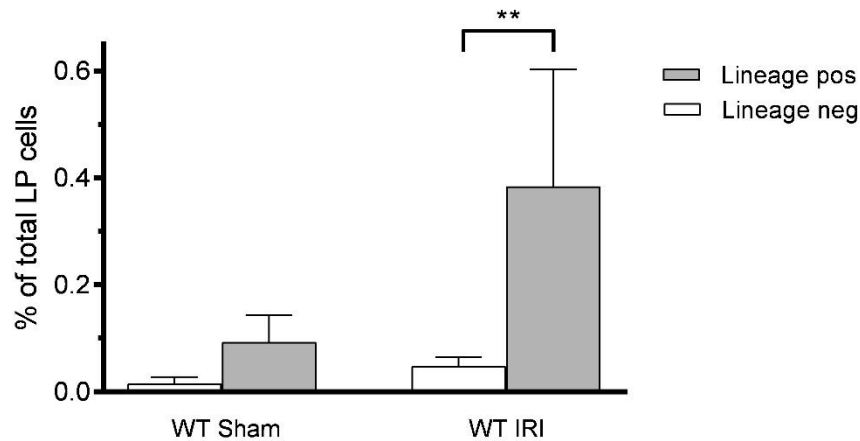
<b><u>ILC-L22 Panel</u></b>		<b><u>ILC-IFN<math>\gamma</math> Panel</u></b>		<b><u>T-Zell Panel</u></b>	
FITC	Lineage	FITC	Lineage	FITC	IL-17A
PE	IL-22	PE	IL-17A	PE	CD4
PeCy7	CD127	PeCy7	CD127	PeCy7	CD8a
APC	NKp46	APC	NKp46	APC	$\gamma\delta$ TCR
APC-Cy7	CD27	APC-Cy7	CD27	APC-Cy7	CD3e
PB	IL-17	PB	IFN $\gamma$	PB	IFN $\gamma$
Aqua	aqua	Aqua	aqua	Aqua	aqua

**Tabelle 5: Etablierte FACS-Panel**

Der *Lineage-channel* auf FITC umfasst hierfür folgende Antikörper: CD3, CD4, CD8, CD19, B220, CD11b und CD11c. Diese Marker sind Marker für T-Zellen (CD3, CD4, CD8), B-Zellen (CD19, B220), Makrophagen/Monozyten (CD11b) und Dendritische Zellen (CD11c), für welche die ILCs selber negativ sind.<sup>(47,48)</sup>

#### 4.2.1 IL-17A Produktion durch die T-Zell Linie

Um nun die Effektorzelle für IL-17A im genutzten Darm-IRI Modell zu identifizieren, wurden IL-17A<sup>+</sup>-Zellen auf ihre *Lineage* Eigenschaft untersucht.

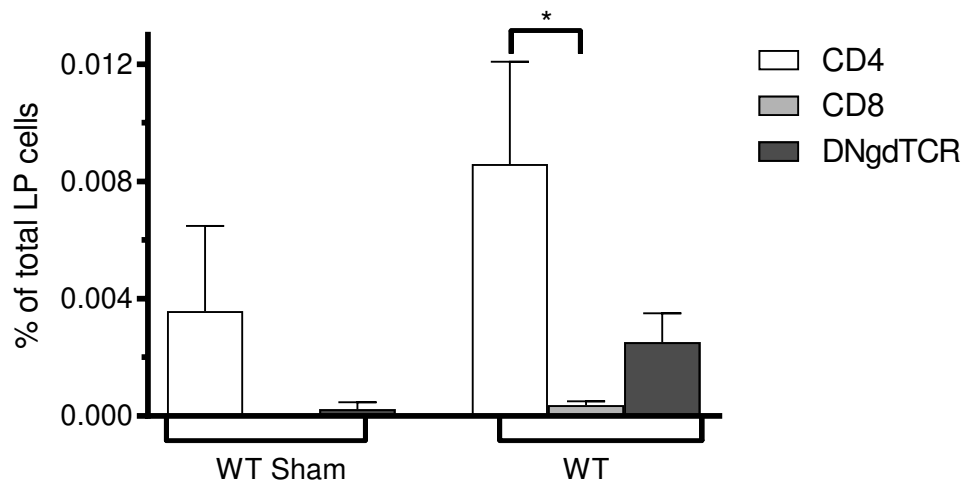


**Abbildung 16: IL-17A Produktion bei *Lineage*<sup>+/+</sup>-Zellen in Wildtyp-Mäusen**  
Signifikant höherer IL-17A Nachweis bei *Lineage*<sup>+</sup> gegenüber *Lineage*<sup>-</sup> bei Wildtyp-Mäusen (\*\* p=0,0052)

Anhand der verwendeten drei FACS-*Panels* zeigten sich bei den T-Zell produzierenden Mäusen als hauptsächliche IL-17A Produzenten *Lineage*-positive (*Lineage*<sup>+</sup>) Zellen (vgl. Abb. 16). Einen signifikant kleineren Anteil stellten in diesem Zusammenhang die *Lineage*-negativen (*Lineage*<sup>-</sup>) Zellen in der FACS-Auswertung dar, welche im Abschnitt 4.2.3 genauer charakterisiert werden (p=0,0052). Der Unterschied zwischen IRI-operierten und Sham-operierten Mäusen war hier jedoch nicht signifikant (p=0,2867).

Wie im Abschnitt 1.3 bereits beschrieben sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligt. Obwohl der genaue Aktivierungsmechanismus noch nicht ausreichend geklärt ist, ist dennoch bekannt, dass sowohl CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, DN $\gamma$ TCR<sup>+</sup>-T-Zellen als auch ILC3s an einem IRI-Prozess mitwirken können.<sup>(7,10,23,32)</sup> Aufgrund der Dominanz der *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen bei den IL-17A<sup>+</sup> Zellen wurde somit das Augenmerk zunächst auf die T-Lymphozyten gerichtet. Mithilfe des T-Zell *Panel* wurden die isolierten Zellen der *Lamina Propria* auf CD3<sup>+</sup> Zellen untersucht. Die als CD3<sup>+</sup> befundenen Zellen wurden daraufhin nun in CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und DN-Zellen unterteilt, CD4<sup>+</sup> für die Th2-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> für die Th1-Helferzellen. Eine IL-17 Produktion wurde bei den untersuchten Wildtyp-Mäusen jeweils bei den CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>- sowie CD3<sup>+</sup>

DN $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen. Augenscheinlich dominiert, wie in Abbildung 18 zu sehen, die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zelle.<sup>(21,23)</sup>



**Abbildung 17: Differenzierung *Lineage*<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> Zellen in CD3<sup>+</sup>-Untergruppen bei WT**

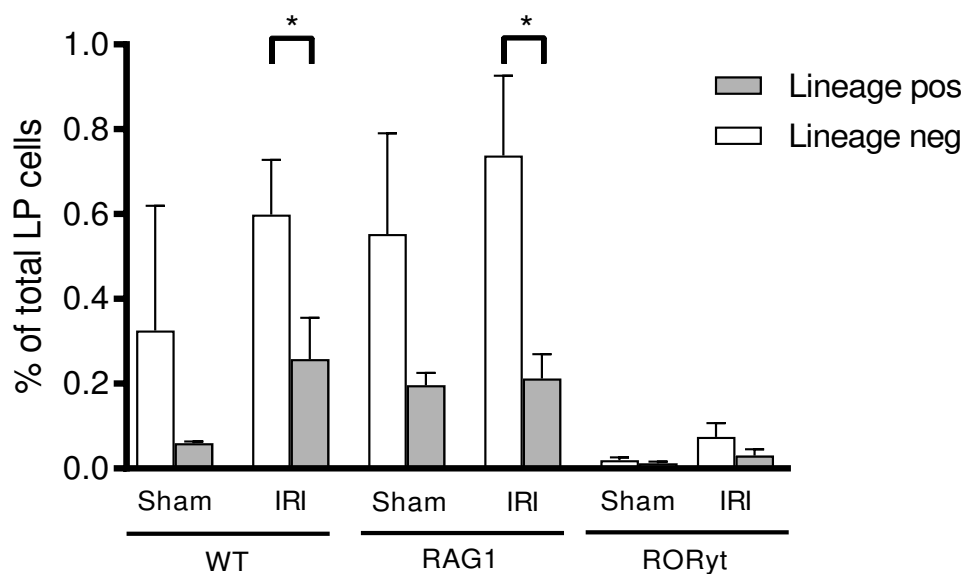
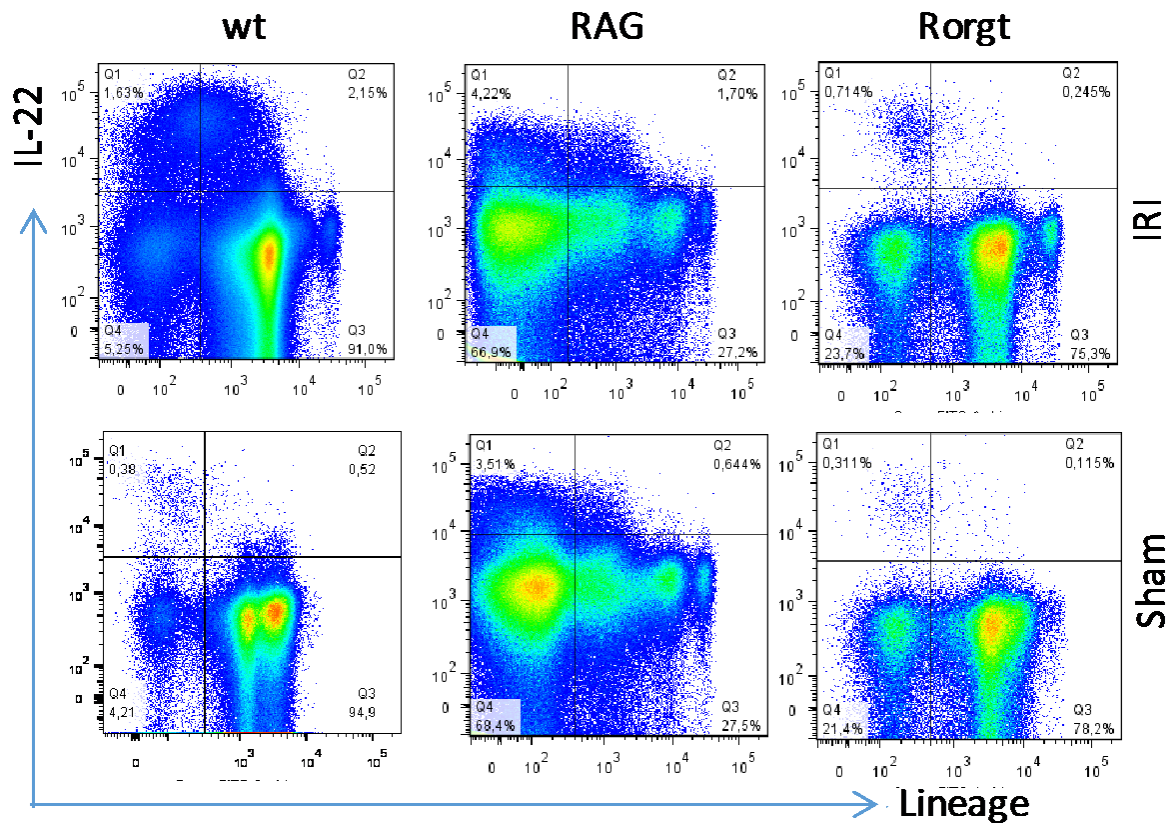
Aufteilung der *Lineage*<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen von Wildtyp-Mäusen in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> sowie DN $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen mit signifikant höherem Nachweis von CD4<sup>+</sup> Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> (\* p=0,0152)

In dieser Arbeit konnte, wie in Abbildung 17 ersichtlich, eine signifikant höhere IL-17A Produktion in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen gegenüber CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup> DN $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden (p=0,0152). Der Unterschied zwischen CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> und DN $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen war mit einem p-Wert von 0,1275 jedoch nicht signifikant.

Unter den *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen treten folglich besonders die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen hervor, bekannt als die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Th17-Zelle, welche bereits in verschiedensten Immunreaktionen nachgewiesen sowie eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen zugesprochen wurde (vgl. Abschnitt 1.4.1).<sup>(21,23,24)</sup> Auch war eine erhöhte, jedoch nicht signifikante IL-17A Produktion nach Ischämie-Reperfusionsschaden detektierbar.

#### 4.2.2 IL-17/IL-22 Produktion durch die Klasse der ILCs

Zur genaueren Beschreibung der IL-17A und IL-22 Produktion durch die ILCs wurde die *Lineage*-Population näher untersucht. Hierfür wurden außerdem die FACS-Auswertungen der einzelnen Tiergruppen graphisch einander gegenübergestellt (vgl. Abb. 18).



**Abbildung 18: IL-22 Produktion durch *Lineage*<sup>+/+</sup>**

**Oben:** Repräsentative Darstellung der IL-22 Produktion durch *Lineage*<sup>+/+</sup> in der FACS-Auswertung; Populationsverschiebung von vielen *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen bei WT zu *Lineage*-Zellen bei RAG1

**Unten:** Gesamtauswertung. Signifikant größere IL-22<sup>+</sup> Population in der *Lineage*-Gruppe bei WT (\* p=0,0493) und RAG1 (\* p=0,0262) im Vergleich zu *Lineage*<sup>+</sup>

Die ermittelten Ergebnisse zeigen eine IL-22 Produktion in beiden *Lineage* Populationen (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz zur IL-17A Produktion, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die IL-22 Produktion bei den IRI-operierten Wildtyp- ( $p=0,0493$ ) und RAG1-Mäusen ( $p=0,0262$ ) jedoch in der *Lineage* Population signifikant ausgeprägter. Deutlich erkennbar ist zudem eine Populationsverschiebung in der FACS-Analyse zwischen Wildtyp- sowie RAG1-Mäusen. Bei den RAG1-Mäusen lässt sich ein deutlich größerer Anteil an *Lineage*-Zellen in der Gesamtpopulation nachweisen, bei den Wildtyp-Mäusen sind es mehr *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen (vgl. Abb. 18).

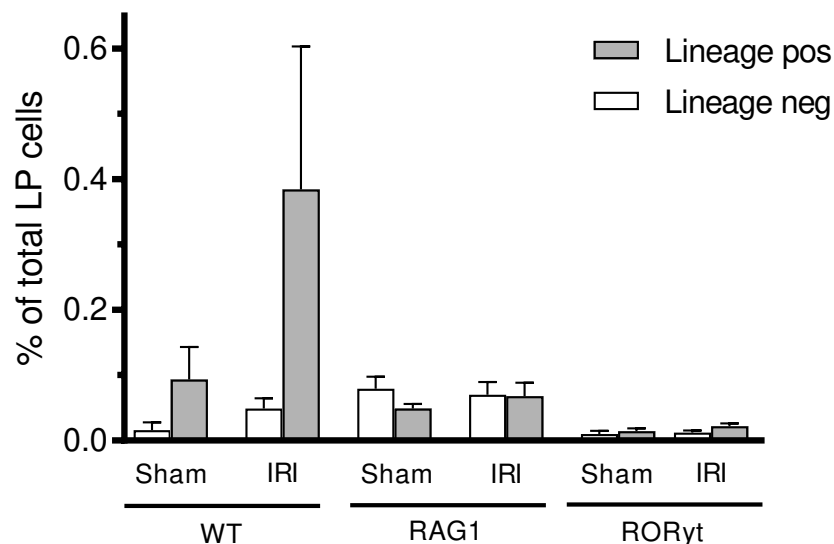
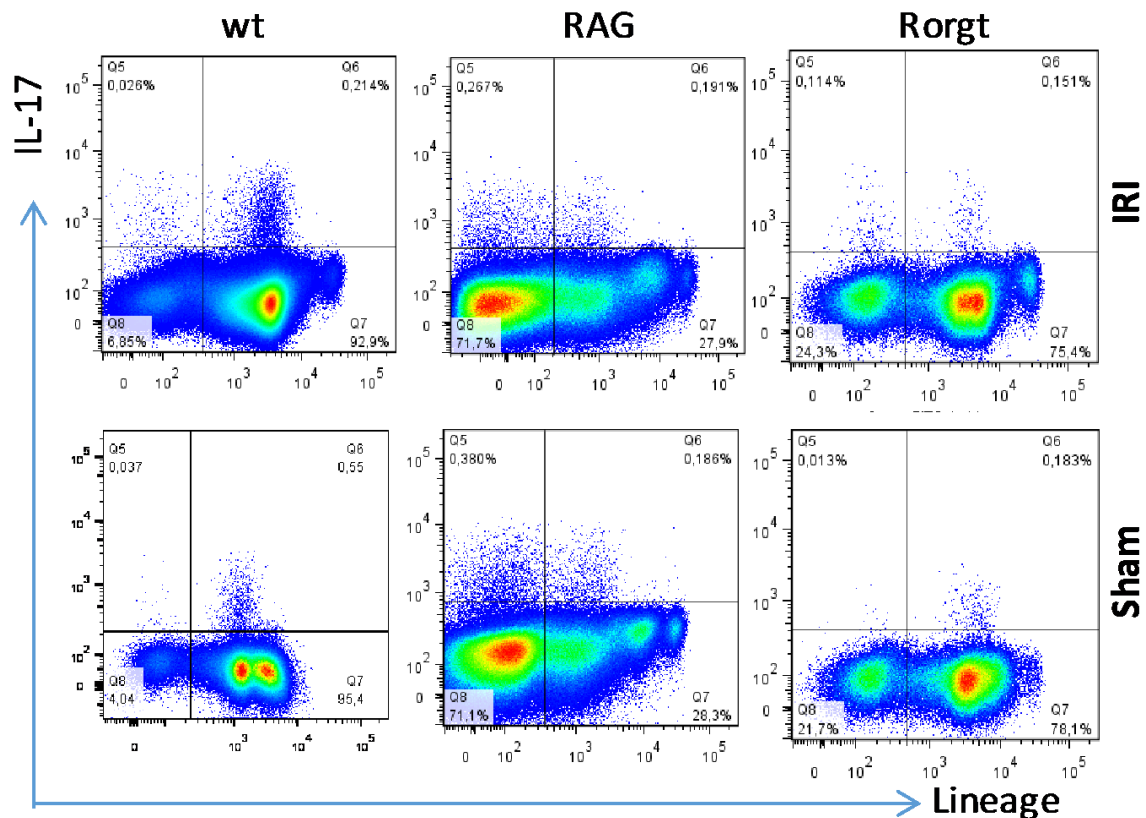
Als Hauptquellen von IL-22 werden aktuell die Th17-Zelle und die Klasse der ILCs angesehen (vgl. 1.3.2).<sup>(18,33)</sup> Um die IL-17A und die IL-22 Produktion in der *Lineage*-Population genauer auszuwerten, wurde anhand aktueller Literatur und zahlreichen Etablierungsversuchen das ILC IL22 FACS-*Panel* (vgl. Tabelle 5 in Abschnitt 4.2) für die Auswertung angewandt. Hierfür wurden die isolierten Zellen jeweils erst auf *Lineage*<sup>-</sup> mit IL-17/IL-22 Produktion *gated*, um diese *Lineage*<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup>/IL-22<sup>+</sup> Population folglich nach ILC-IL22 *Panel* auf CD127, CD27 und NKp46 Expression zu untersuchen. Laut Literatur lässt sich der Hauptanteil der IL-17/IL-22 Produktion bei der *Lineage*-Population mit unterschiedlichen *Gating*-Verfahren jeweils auf eine *Lineage*<sup>-</sup> IL-22<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> NKp46<sup>-</sup> Subpopulation zurückverfolgen (vgl. Tabelle 5).<sup>(33,35,41)</sup> Diese Marker-Konstellation beschreibt bei Mäusen laut aktuellem Forschungsstand *Innate Lymphoid Cells* Typ III, welche als Zellen des angeborenen Immunsystems in der *Lamina Propria* der Darmschleimhaut wichtige Quellen für IL-22 sowie IL-17A darstellen (vgl. Abschnitt 1.3.2).<sup>(32,37,41,48)</sup>

### 4.3 Unterschiede im IRI Schaden hinsichtlich IL-17A/IL-22 Produktion

Nach Auswertung der Ergebnisse bei den Wildtyp-Mäusen können diese jetzt mit den anderen Tierstämmen verglichen werden. ROR $\gamma$ t als wichtiges Steuerelement in der IL-17A/IL-22 Produktion sowie das Fehlen von T-Zellen in den RAG1-Mäusen als wichtige Produktionsquelle sind somit ein guter Anhaltspunkt für die Beteiligung von IL-17A/IL-22 im IRI-Prozess. Wie in Abschnitt 4.2 bereits beschrieben haben wir im genutzten Modell die Th17 Zelle als Hauptquelle von IL-17A und die ILC3s von IL-22 identifiziert. Die Ergebnisse des Chiu-Score-Vergleich müssen nun durch die gewonnenen Informationen aus der FACS-Auswertung ergänzt werden.

### 4.3.1 Geringerer IRI-Score und IL-17A in RAG1-/RORyt-KO-Mäusen bei geringerer IL-17A Produktion

Wie in Abschnitt 4.2.2 bereits für IL-22 beschrieben, erfolgte für den Vergleich von IRI-Score und IL-17A eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Tiergruppen.



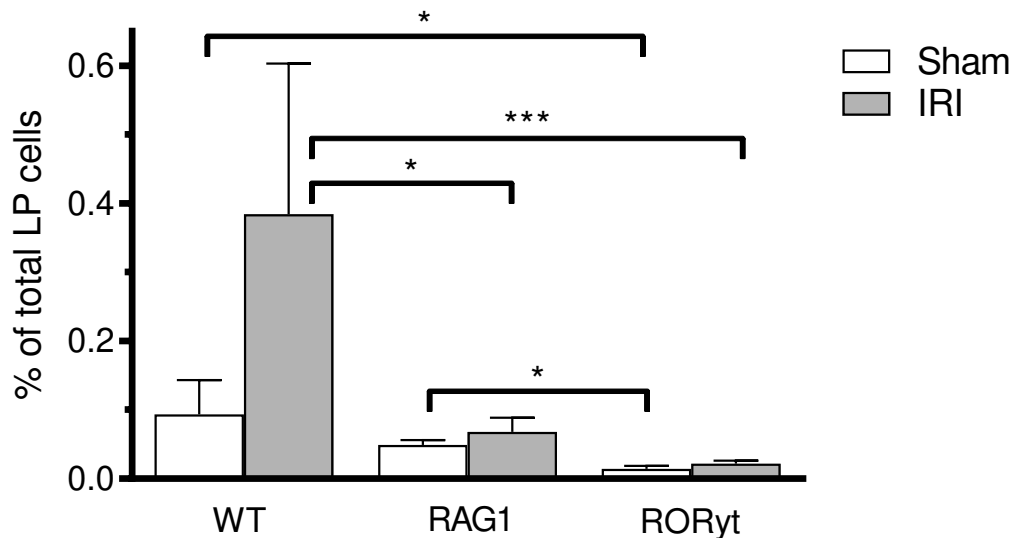
**Abbildung 19: IL-17A Produktion durch *Lineage*<sup>+/+</sup>**

**Oben:** Repräsentative Darstellung der IL-17A Produktion durch *Lineage*<sup>+/+</sup> in der FACS-Auswertung mit Populationsverschiebung in RAG1-Mäusen zugunsten der *Lineage*<sup>-</sup>-Zellen

**Unten:** Gesamtauswertung. Signifikant größere IL-17A Population bei *Lineage*<sup>+/+</sup>-Zellen gegenüber *Lineage*<sup>-</sup>-Zellen bei WT (p=0,0052)



In der FACS-Auswertung stellte sich bei RAG1-Mäusen eine starke Verschiebung der Zellpopulation zugunsten der *Lineage*<sup>-</sup> Zellen im Vergleich zu den Wildtyp- sowie RORyt-Mäusen dar (vgl. Abb. 19).



#### Abbildung 20: IL-17A Produktion in *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen

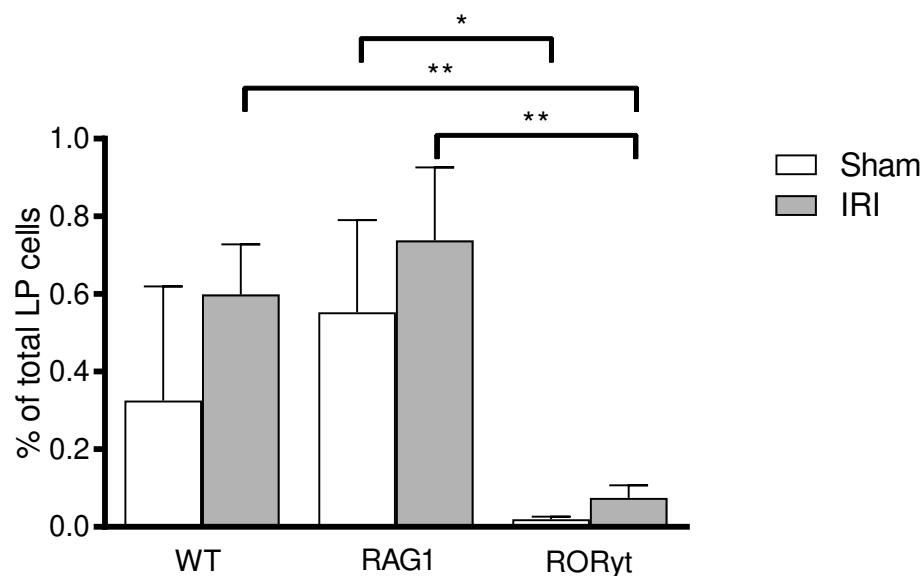
Signifikant größere IL-17A Population in der WT-IRI Gruppe im Vergleich zu RAG1- (\* p=0,033) sowie RORyt-Mäusen (\*\*\*) 0,0007; außerdem bei RORyt-Sham-Mäusen niedrigere IL-17A Werte im Vergleich zu WT-Sham (\* p=0,0357) und RAG1-Sham (\* p=0,0159)

Auch zeigte der RAG1-Stamm, wie in Abbildung 20 zu sehen, in den Versuchen eine geringere Anzahl an *Lineage*<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> Zellen in der Analyse. Der Unterschied an *Lineage*<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> Zellen, Hauptquelle für IL-17A in WT-Mäusen, war in der IRI-induzierten Wildtyp-Gruppe gegenüber den RAG- (p=0,033) und RORyt-Mäusen (p=0,0007) signifikant höher. Als weiteres Ergebnis ließ sich bei Wildtyp (p=0,0357) und RAG1 Sham-Tieren (p=0,0159) eine repräsentativ vermehrte IL-17A Produktion im Vergleich zur RORyt-Gruppe ermitteln. Bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben, wurden bei Wildtyp-Mäusen mehr Gesamt-Chiu-Scores von über 3 als bei RAG1- sowie RORyt-Mäusen erreicht. Auch war die Chiu-Score Analyse in der Wildtyp-Gruppe signifikant höher als bei den RAG1-Mäusen (vgl. Abb. 11). Es konnte somit in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen hohen IL-17A-Werten und einem höheren Chiu-Score nach induzierter Darmischämie im genutzten Mausmodell festgestellt werden.



#### 4.3.2 Vermehrt IL-22 in RAG-1- sowie IFN $\gamma$ in RORyt-KO-Mäusen bei geringerem IRI-Score

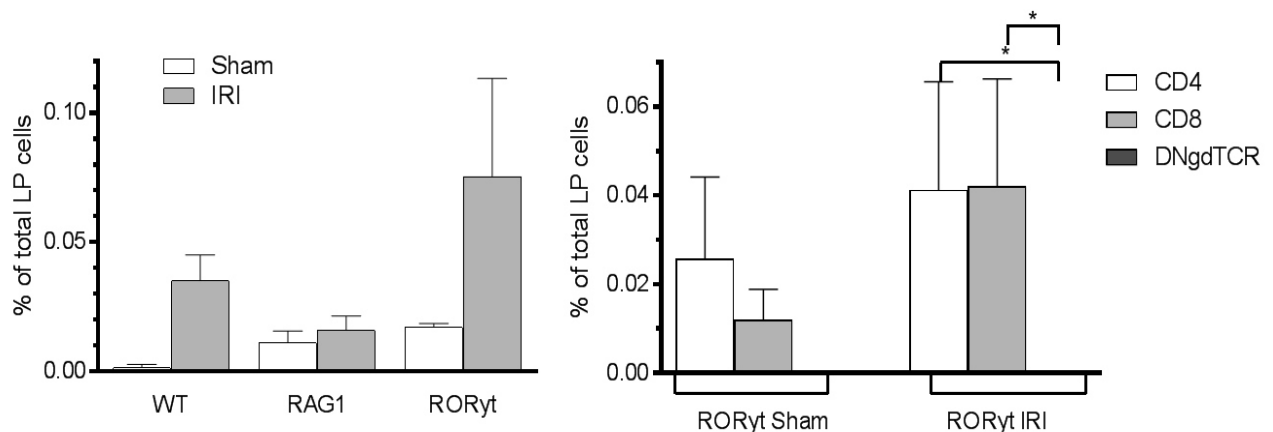
Es zeigte sich, wie in 4.2.2 ersichtlich, eine signifikant ausgeprägtere IL-22 Produktion bei WT- und RAG1-Mäusen durch *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen. Für einen Vergleich zwischen IL-22 Produktion und Auswirkung auf den IRI-Score ist somit die IL-22<sup>+</sup> *Lineage*<sup>+</sup> Population der einzelnen Tiergruppen von Bedeutung.



**Abbildung 21: IL-22 Produktion in *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen**

Bei RORyt-KO-Mäusen signifikant geringere IL-22<sup>+</sup> Zellpopulation im Vergleich zu WT (\*\* p=0,0031) sowie RAG1 (\*\* p=0,0023); weiterhin weniger IL-22 Produktion bei RORyt-KO-Sham- als bei RAG1-Sham-Mäusen (\* p=0,0159)

Hinsichtlich IL-22 Produktion bei *Lineage*<sup>+</sup> Zellen wurde die höchste Anzahl an IL-22<sup>+</sup> Zellen bei RAG1-Mäusen registriert. Diese war jedoch gegenüber den WT-Mäusen nicht signifikant erhöht (p=0,6009) (vgl. Abb. 21). Im Vergleich zu den RORyt-Mäusen ließen sich aber bei WT- (p=0,0031) sowie RAG1-Mäusen (p=0,0023) signifikant mehr IL-22<sup>+</sup> Zellen nachweisen. Des Weiteren konnte in der RAG1-Gruppe bei den Sham-operierten Mäusen gegenüber der RORyt-Sham-Gruppe eine signifikant größere Menge an IL-22<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden.



**Abbildung 22: IFN $\gamma$  Produktion in *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen**

**Links:** IFN $\gamma$  Produktion in *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen in verschiedenen Mäusestämmen

**Rechts:** Weitere Differenzierung der *Lineage*<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/DN $\gamma$  $\delta$ TCR Subgruppen; signifikant geringere Anzahl an IFN $\gamma$ <sup>+</sup> DN $\gamma$  $\delta$ TCR-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> (\* p=0,0286) sowie CD8<sup>+</sup> (\* p=0,0286)

Weiterhin konnte zu diesen Ergebnissen, neben einer nur sehr geringen Ausprägung von IL-17A/IL-22 bei RORyt-Mäusen (vgl. Abb. 20 und 21), eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion bei *Lineage*<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 22). Diese IFN $\gamma$ <sup>+</sup> *Lineage*<sup>+</sup> Zellen erwiesen sich in der RORyt-Gruppe bei näherer Untersuchung als hauptsächlich CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup>.

Zusammenfassend stellte sich bei den IRI-induzierten RAG1-Mäusen eine Verschiebung der Zellpopulation zugunsten *Lineage*<sup>-</sup>, eine geringere IL-17A Gesamtproduktion besonders bei den *Lineage*<sup>+</sup>-Zellen, eine höhere, jedoch insignifikante, IL-22 Produktion durch *Lineage*<sup>-</sup>-Zellen sowie ein signifikant geringerer Chiu-Score im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen dar. Bei RORyt-Mäusen konnte bei Abwesenheit des Transkriptionsfaktor RORyt nur noch eine geringfügige IL-17A/IL-22 Produktion nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich jedoch eine höhere Anzahl an *Lineage*<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in den operierten RORyt-Mäusen als den restlichen Gruppen gepaart mit geringeren Chiu-Score Werten.

## 5 Diskussion

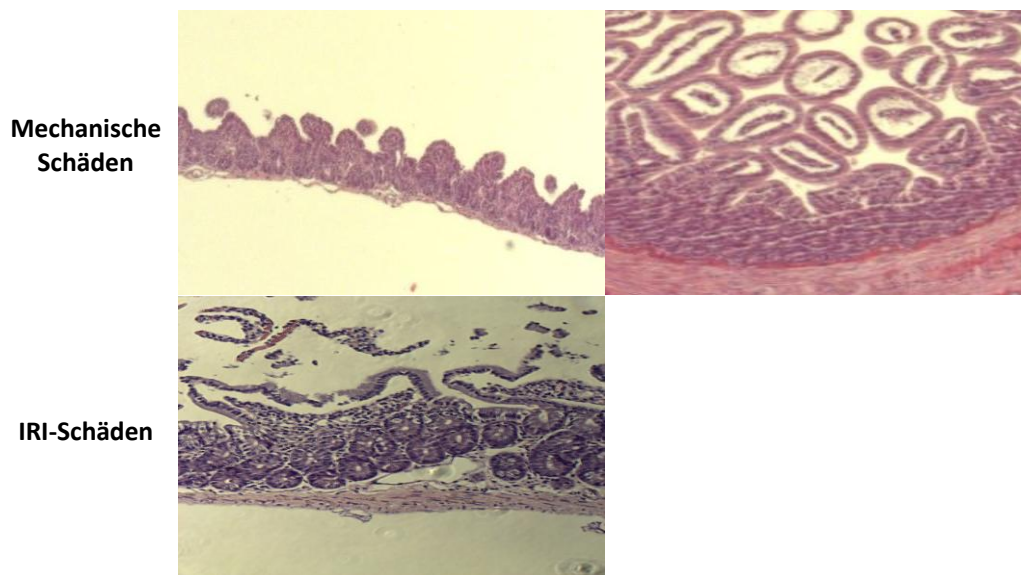
### 5.1 Das angewandte Darm-IRI-Modell und der Einsatz des Chiu-Scores

Das eingesetzte Darmischämie-Modell mit Abklemmung der *A. mesenterica superior* nach dem Abgang aus der Bauchaorta um eine 60-minütige warme Ischämie des Dünndarmes hervorzurufen, hat sich als geeignetes und mögliches Modell zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens am Darm gezeigt. Auch der für diese Arbeit eingesetzte Chiu-Score erwies sich als geeignetes *Scoring*-Verfahren der folgenden Darmschädigung.<sup>(44)</sup>

Im Rahmen der Vor- und Etablierungsversuche zeigte sich für diese Arbeit eine Ischämiezeit von 60 Minuten und eine Reperusionszeit von 15 Stunden als methodisch sinnvoll. Ein signifikanter Unterschied zwischen einer 45- und 60-minütigen Ischämiezeit hat sich in den Versuchen nicht ergeben.

Mithilfe der Sham-Gruppe konnte ein histologisch nachgewiesener Zottenschaden durch die warme Ischämie infolge der Abklemmung der *A. mesenterica superior* dargestellt werden. Eine Schädigung aufgrund des durch die Prozedur verursachten Stresses für die Tiere, durch Narkose oder mechanisch durch Darmmobilisation und Arterienfreilegung konnte so ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis zeigte sich bei allen Sham-Gruppen der verschiedenen Tiergruppen.

Aufgrund der in der Literatur fehlenden einheitlich beschriebenen Darmischämie-Modelle und Operationsverfahren lässt sich leider kein direkter Vergleich ziehen, ob die in dieser Arbeit angewendete Methodik besser oder schlechter für die durchgeführten Experimente geeignet ist.<sup>(31,32,49)</sup> Dies ist auch der noch nicht sehr häufig untersuchten Thematik der Darmischämie im Mausmodell geschuldet. Auch der Einsatz des Chiu-Scores erwies sich deshalb als schwierig, da die Methodik des *Scoring* selten beschrieben wurde. Durch die fehlenden Vergleichsmöglichkeiten war die Etablierung des Chiu-Scores eine der möglichen Komplikationsquellen des Experimentes.<sup>(44,45)</sup> Durch die zahlreichen Vor- und Etablierungsversuche wurde dieses Risiko durch Erfahrungszuwachs deutlich gesenkt. Eine der großen Hürden im Chiu-Score war das Miteinbeziehen von mechanischen Schäden, die durch die postoperative Probenentnahme und histologische Aufarbeitung entstehen können (z.B. unvorsichtiges Hantieren mit der Pinzette) (siehe Abb. 24).



**Abbildung 23: Vergleich mechanischer Schäden und IRI-Schäden**

**Links oben:** Mechanische Abtragung von Wandschichten während der Aufarbeitung

**Rechts oben:** Frei flottierende Zotten bei sonst intakter Darmstruktur (Anschnittphänomen)

**Links unten:** Durch IRI-OP verursachter Schaden (Chiu-Score 5)

Alle Probleme und Schwierigkeiten des Darmischämie-Modells und des Chiu-Score miteinbezogen, zeigte sich die angewendete Methodik im Rahmen dieser Arbeit als praktikabel und vergleichbar.

## 5.2 Ausgeprägte Ischämieresistenz des Ileums

In anatomischen Lehrbüchern zeichnet sich ein einheitliches Bild über die Blutversorgung der abdominalen Organe des Menschen ab: Die drei großen Abgänge der Bauchaorta der *Truncus coeliacus*, die *A. mesenterica superior* und die *A. mesenterica inferior*. Dabei gibt es Unterschiede in der Versorgung des Magen-Darm-Traktes durch die einzelnen Arterienäste. Laut eingängiger Literatur wird das Duodenum aus indirekten Ästen des *Truncus coeliacus* und der AMS gespeist. Somit besteht in diesem Bereich eine Anastomose zwischen dem *Truncus coeliacus* (*Rr. duodenales* der *A. gastroduodenales*) und der AMS (*A. pancreaticoduodenalis inferior*). Der restliche Dünndarm, bestehend aus Jejunum und Ileum, ist Teil des oberen mesenterialen Versorgungstyps und wird aus zahlreichen Ästen der AMS versorgt (*Aa. jejunaes*, *Aa. ileales* und am terminalen Ileum noch *A. ileocolica*). Der Dickdarm mit *Appendix vermiformis* und Colon besitzt oral der *Flexura coli sinistra* einen oberen mesenterialen Versorgungstyp (*Aa. colicae* und *A. ileocolica*) und aboral der *Flexura coli sinistra* einen unteren mesenterialen Versorgungstyp mit

Ästen aus der *A. mesenterica inferior* (*A. colica sinistra* und *Aa. sigmodideae*). Aufgrund zahlreicher Anastomosen in den darmnahen Arkaden sind Durchblutungsstörungen in der Regel selten im Darm.<sup>(50,51)</sup>

Die anatomische Beschaffenheit der Maus zeigt einen sehr ähnlichen Aufbau der Blutversorgung des Dünndarmes. Die *A. mesenterica superior* versorgt hier den embryonalen Mitteldarm, welcher sich von der Mitte des zweiten Teils des Duodenums bis zum proximalen 2/3 des *Colon transversum* erstreckt. Auch hier lassen sich zahlreiche Anastomosen zwischen den Darmarterien finden.<sup>(52,53)</sup>

In dieser Arbeit wurde die Blutversorgung des Dünndarmes direkt nach Abgang der *A. mesenterica superior* aus der Bauchaorta mithilfe einer Klammer für 60 Minuten unterbrochen. Dies würde nach Literatur einen Bereich zwischen distalen Duodenum bis Teile des *Colon transversum* in der Maus abdecken. Weiterhin bestehen Möglichkeiten einer Ersatzversorgung über Anastomosen mit den *Truncus coeliacus* und der *A. mesenterica inferior*. Die daraus resultierende Darmischämie wurde dann anhand des Chiu-Scores ausgewertet. Es wurden dafür Abschnitte im Bereich des distalen Duodenums/Jejunums mit Teilen des distalen Ileums histologisch verglichen.<sup>(44,52)</sup> In den Ergebnissen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Chiu-Score zwischen Jejunum und Ileum im verwendeten Ischämiemodell. Außerdem stellte sich kein signifikanter histologischer Unterschied zwischen IRI- und Sham-Gruppe an den Ileumproben dar. Im Gegensatz dazu gab es am distalen Duodenum/Jejunum einen ausgeprägten Unterschied zwischen IRI- und Sham-Gruppe (vgl. Abb. 13 und 14).

Diese beiden sehr deutlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass im distalen Ileum der Maus eine suffiziente Blutversorgung aus einer anderen Quelle als der *A. mesenterica superior* stattfand, sei es über Anastomosen mit der *A. mesenterica inferior* oder auf einem anderen Weg. Das distale Duodenum und Jejunum hingegen scheint aufgrund der ausgeprägten IRI-Schäden einen erheblichen Anteil seines Blutes über die AMS zu beziehen und eine Ersatzversorgung über Anastomosen mit dem *Truncus coeliacus* nicht oder nur unzureichend gegeben ist. Zusätzlich können diese Funde auch für eine potentielle verstärkte Ischämieresistenz, also eine größere Toleranz gegenüber Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, des distalen Ileums im Vergleich zum distalen Duodenum sprechen. Diese Ergebnisse würden die

strenge Unterteilung der Blutversorgung im Magen-Darm-Trakt hinterfragen und einen neuen Blickwinkel auf potentielle Möglichkeiten in der Anastomosierung für suffiziente Blutversorgung bei Darmischämie eröffnen.

### **5.3 Klassische Th-17 Zelle als Hauptproduzent von IL-17A im Darm-IRI Modell**

Die durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Lymphozyten in der *Lamina propria* dieser Arbeit lässt den Schluss zu, dass die Gruppe der klassischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Th17 Zelle, wie in der Literatur dokumentiert, auch im Darm als Hauptquelle von IL-17A fungiert.<sup>(21,23–25)</sup> Wie bereits in IRI-Versuchen in der Leber gezeigt wurde, kam es zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-17A aufgrund des Ischämieschadens.<sup>(27,54–56)</sup> Im Darm-IRI-Prozess wurde IL-17A bereits eine essenzielle Rolle zugesprochen. Jedoch wurden in der Arbeit von Lee *et al.* 2013 für die IL-17A Produktion Paneth-Zellen hauptverantwortlich gemacht.<sup>(31)</sup> In jener Arbeit wurden dafür Paneth-Zellen durch Dithizone-Behandlung sechs Stunden vor der Ischämie entleert. Es zeigte sich daraufhin eine signifikante Reduktion der IL-17A Ausschüttung und zudem ein Rückgang der Ischämieschäden.<sup>(31)</sup> Im Gegensatz zur Paneth-Zelle wurde in unserer Arbeit die klassische Th-17 Zelle als Hauptquelle der IL-17A Produktion gefunden. Klose *et al.* 2014 hat in einer Arbeit Paneth-Zellen in der FACS-Auswertung in einer spezifischen Population nach CD27<sup>+</sup> *gated*. Paneth-Zellen wurden in verschiedenen Arbeiten als bei Mäusen CD27<sup>+</sup> detektiert.<sup>(57–59)</sup> Jener Versuch, diese Paneth-Zell-Population aufzufinden, führte in dieser Arbeit aber zu keinem Ergebnis, da die von Klose *et al.* definierte Population in unseren Versuchen keine IL-17A Produktion vorwies.<sup>(57)</sup> Dass keine Paneth-Zellen mit IL-17A detektiert worden sind, könnte jedoch der Methodik der Zellisolation mit dem "*Lamina Propria Dissociation Kit mouse*" der Firma MACS MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, in dieser Arbeit geschuldet sein, da das genutzte Kit nur Zellen aus der Lamina Propria isoliert, Paneth-Zellen jedoch bereits in der Tiefe der Krypten liegen.<sup>(59)</sup> In einer neueren Publikation von Geha *et al.* 2017 wurde den ILC3s eine essenzielle Rolle in der IL-17A Produktion im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens zugesprochen.<sup>(32)</sup> Die Ergebnisse von Geha *et al.* 2017 zeigen eine Korrelation mit denen unserer Arbeit. Auch hier wurden die ILC3 als wichtige IL-17A Quelle identifiziert (vgl. Abschnitt 4.2.2), gleichzeitig wurde auch die

Rolle der Paneth-Zelle für die IL-17A Produktion im IRI-Prozess, wie von Lee *et al.* 2013 postuliert, hinterfragt.<sup>(31,32)</sup> Ebenso zeigten Geha *et al.* 2017, dass IL-17 produzierende  $\gamma\delta$ TCR-Zellen beim IRI nur eine geringe Rolle spielen, was sich mit unseren Ergebnissen deckt (vgl. Abschnitt 4.2.1).<sup>(32)</sup>

Abschließend wurde in unserer Arbeit somit, im Gegensatz zur Paneth-Zelle oder ILC3s, vielmehr die klassische Th17 Zelle als Hauptquelle der IL-17A Produktion gefunden (vgl. Abschnitt 4.2). Durch die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten im Rahmen des intestinalen IRI-Vorgangs stellt sich die Frage, ob man diesen komplexen pathophysiologischen Vorgang auf einzelne Immunzellen differenzieren sollte oder nicht eher eine breitgefassere Herangehensweise sinnvoller wäre.

### 5.4 ILC3-Beteiligung bei Darmischämie

Ein Ischämie-Reperfusionsschaden stellt, wie in den einleitenden Abschnitten dieser Arbeit beschrieben, einen komplexen Sachverhalt aus inflammatorischen Prozess mit Beteiligung von angeborenem und erworbenen Immunsystem (vgl. Abschnitt 1.2.1) dar.<sup>(7,12)</sup> Als klinisch am meisten relevante Immunzellen wird in der IRI-Forschung der Fokus oftmals auf Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen, Plättchen oder Endothelzellen gelegt.<sup>(7,12)</sup> Da wir uns in dieser Arbeit über die Interleukin-Produktion an die beteiligten Immunzellen herangearbeitet haben, konnte die Gruppe der ILCs im IRI-Prozess genauer untersucht werden. Bemerkenswerterweise ist die Rolle der ILCs im Rahmen der IRI noch nicht oft untersucht worden, obwohl ihnen wichtige pathomechanische Funktionen zugesprochen werden, wie z.B. bei GvHD (siehe Abschnitt 1.4.3).<sup>(37,41,48)</sup>

Geha *et al.* 2017 haben in einer neueren Arbeit, wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, die IL-17A Produktion durch *Innate Lymphoid Cells* im Rahmen der Darmischämie untersucht.<sup>(32)</sup> Im Gegensatz zu Geha *et al.* wurde in dieser Arbeit vom produzierten IL-17A ausgehend die Effektorzelle identifiziert. Durch Einsatz eines *Lineage-channels* konnten wir mit ausgewählten Markern (vgl. Abschnitt 4.2) eine IL-17A<sup>+</sup>/IL-22<sup>+</sup> ILC-Population und nonILC-Population herausfiltern. Hierbei zeigte sich, wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, eine IL-17A Produktion in beiden Fraktionen, in *Lineage*<sup>+</sup> signifikant mehr als in *Lineage*<sup>-</sup>. Für IL-22 war hingegen die

*Lineage*<sup>-</sup> Fraktion ausschlaggebend (vgl. Abschnitt 4.2). Durch Einsatz des RAG1-Mausstammes, konnte eine Verschiebung der Immunzellpopulation durch das Fehlen von B-/T-Zellen aus der *Lineage*<sup>+</sup>- Richtung *Lineage*<sup>-</sup>-Population mit reziproker IL-17A/IL-22 Produktion nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.2.2).<sup>(46)</sup> Diese Populationsverschiebung zu den *Lineage*-Zellen, somit auch den ILC3s, mit veränderter Zytokinproduktion zeigte anhand des niedrigeren Chiu-Scores bei RAG1-Mäusen einen Einfluss auf den IRI-Vorgang, was einen Rückschluss auf eine wichtige Rolle der ILC3s im verwendeten Darm-IRI Mausmodell erlaubt (vgl. Abschnitt 4.3.2).

Die Ergebnisse unserer Arbeit können daher ILC3s eine wichtige Rolle im Rahmen des IRI-Prozesses, wie Geha *et al.* 2017 bereits darstellten, zusprechen.<sup>(32)</sup> Der Hauptunterschied liegt jedoch darin, dass in dieser Arbeit die IL-22 Produktion durch die ILC3s als essenzieller Punkt angesehen wird und für die IL-17A Produktion weiterhin die Th17 Zelle eine zentralere Rolle spielt (vgl. vorherigen Abschnitt).

### **5.5 Protektive Wirkung von IL-22 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens des Darmes**

In Zusammenschau aller Ergebnisse und bereits diskutierten Punkte scheint sich die inflammatorische Wirkung von IL-17A in Rahmen der Darm-IRI im Mausmodell, wie bereits in anderen Arbeiten untersucht, zu bestätigen.<sup>(23,31,32)</sup> Die höchste IL-17A Produktion ließ sich in dieser Arbeit bei operierten Wildtyp-Mäusen detektieren, also die Mäuse mit den höchsten Chiu-Score Werten (vgl. Abschnitt 4.1). Diese Korrelation zwischen IRI-Schäden und IL-17A Produktion wurde schon in mehreren anderen Organsystemen wie Leber, Lunge, Niere sowie Herz oder Hirn nachgewiesen.<sup>(60–64)</sup>

Die konkrete Rolle von IL-22 im Darm-IRI Pathomechanismus wurde bis jetzt noch nicht genauer untersucht. Jedoch konnte in verschiedenen Arbeiten bereits eine protektive Wirkung von IL-22 bei Leber-IRI sowie Nieren-IRI gezeigt werden.<sup>(28,65)</sup> Eggenhofer *et al.* 2016 konnten durch Einsatz unterschiedlicher *Knockout*-Mäuse eine protektive Wirkung von IL-22 produzierenden RORγt<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup> Zellen (NK22) bei Leberischämie identifizieren. Hierbei gelang es unter anderem einen signifikant erhöhten Ischämie-Reperfusionsschaden in RAG1-RORγt-DKO (*Double Knockout*)



Mäusen ohne RORyt<sup>+</sup> NK22 zu demonstrieren.<sup>(28)</sup> In einer Arbeit von Xu *et al.* 2014 konnte eine nierenprotektive Wirkung von IL-22 im IRI-Prozess durch mitunter Gabe von rekombinanten IL-22 veranschaulicht werden. Es zeigte sich unter anderem ein geringerer Ischämie-Reperfusionsschaden in der histologischen Auswertung sowie niedrigere Harnstoff und Kreatininwerte als in der Wildtyp und IL-22 *Knockout* Gruppe.<sup>(65)</sup> Im hier verwendeten warmen Darm-IRI Mausmodell konnte im Rahmen dieser Arbeit eine IL-22 Produktion durch ILC3s im Hinblick auf die Darmischämie nachgewiesen werden. Dabei zeigten die IRI-induzierten RAG1-Mäuse durch die Populationsverschiebung eine weiterhin bestehende IL-17A Produktion mit jedoch erhöhter IL-22 Produktion durch die *Lineage*<sup>-</sup> Zellen vor (vgl. Abschnitt 4.3.2). In diesem Zusammenhang zeigte sich außerdem ein (im Vergleich zu den WT-Mäusen) geringerer Durchschnitts-Chiu-Score, was für eine gewebeprotektive Rolle von IL-22 sprechen kann. Bei den RORyt-Mäusen wurde ein ähnlicher Chiu-Score mit kaum IL-17A/IL-22 Produktion festgestellt, was auf die IL-17/IL-22 Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor RORyt zurückzuführen ist.<sup>(19,22)</sup> Es steht zur Diskussion, ob der geringere Ischämie-Reperfusionsschaden in den RORyt-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen durch das signifikant niedrige IL-17A oder durch eine vermehrte IFN $\gamma$  Produktion durch *Lineage*<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen bedingt ist (vgl. Abschnitt 4.3.2). Unterschiedliche Arbeiten weisen auf eine Regulationsfunktion von IFN $\gamma$  für die Homöostase der gastrointestinalen Schleimhaut hin.<sup>(66–68)</sup>

## 5.6 Fazit

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klassische Th-17 Zelle auch beim Ischämie-Reperfusionsschaden des Darmes eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von inflammatorisch wirkendem IL-17A spielt. Es konnte ein größerer IRI in Darmgewebe mit vermehrter IL-17A Produktion nachgewiesen werden, was auch aktueller Literatur entspricht.<sup>(31,32)</sup> Außerdem konnte die Klasse der ILC3s als essenzielle Quelle von IL-17A sowie IL-22 im Ischämie-Reperusionsprozess charakterisiert werden. Im Laufe dieser Arbeit wurde in einer aktuellen Publikation von Geha *et al.* 2017 die besondere Rolle der IL-17A Produktion durch ILC3s postuliert.<sup>(32)</sup> Bemerkenswerterweise ist bis jetzt die Funktion von IL-22 im Ischämie-Reperfusionsschaden im Darm noch nicht näher untersucht worden. Hier konnten wir

eine protektive Wirkung auf einen potentiellen Ischämie-Reperfusionsschaden durch von ILC3 produziertem IL-22 feststellen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse werfen ein neues Licht auf den Vorgang des Ischämie-Reperfusionsschadens im Darm. Es wird die klassische Th17 Zelle ins Zentrum gerückt und mit den ILC3s, eine in diesem Zusammenhang noch relativ unerforschte Zellpopulation, näher beleuchtet. Abschließend sind die Ergebnisse auch vielversprechend im Hinblick auf mögliche Therapieansätze mittels IL-22 gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden. Verschiedene Arbeiten zeigten bereits Versuche einer gewebeprotectiven Therapie mit rekombinanten IL-22 in unter anderem entzündlichen Darmerkrankungen, Paracetamol-induziertem Leberschaden oder auch bei Nierenischämie.<sup>(34,69,70)</sup> Dies könnte nach weiterer Forschung auch für IRI des Darmes gelten.

### 5.7 Ausblick

Es konnten mithilfe dieser Dissertation einige Fragen bezüglich beteiligten Zellpopulationen in der IL-17/IL-22 Produktion und Wirkung von IL-22 im Rahmen des Darm-IRI Geschehens beantwortet werden. Jedoch bleiben weiterhin viele Fragen offen, welche weitere intensive Forschung benötigen:

- Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren alle auf einem Mausmodell der warmen Darmischämie. Somit bleibt die Frage, inwiefern sich diese Ergebnisse auf andere Modelle oder den Menschen ableiten lassen.
- Ebenso ist abzuklären, weshalb in unterschiedlichen Arbeiten verschiedene Hauptquellen von IL-17A detektiert wurden.
- Des Weiteren ist nicht geklärt, durch welchen Mechanismus IL-22 Einfluss auf die Gewebeintegrität im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens des Darmes ausübt. Wie bedingen sich die IL-17/IL-22 Produktion in den ILC3s?
- Hat IFN $\gamma$  einen positiven Effekt auf den IRI-Mechanismus, wie die Ergebnisse der ROR $\gamma$ t-Mausgruppe es vermuten lassen?

## 6 Zusammenfassung

Der nicht zu unterschätzende Ischämie-Reperfusionsschaden bei verschiedenen Krankheitsbildern sowie der Organtransplantation fordert ein tieferes Verständnis und neue Behandlungsansätze. In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte bereits der inflammatorische Charakter von IL-17 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens und die gewebeprotective Funktion von IL-22 nachgewiesen werden. Jedoch wurden bei der Darmischämie bis jetzt keine konkludenten Daten bezüglich einer IL-17 Quelle erhoben. Hierbei zeigten sich in verschiedenen Arbeiten unterschiedliche IL-17 Quellen: Paneth-Zellen sowie ILC3s.<sup>(31,32)</sup>

Bemerkenswerterweise wurde die Rolle von IL-22 in der Darmischämie bisher noch nicht weiter untersucht. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die IL-17A<sup>+</sup>/IL-22<sup>+</sup> Hauptpopulationen ermittelt sowie der Einfluss von IL-17A/IL-22 auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell der warmen Darmischämie untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Mausmodell mit einer 60-minütigen warmen Ischämie des Dünndarmes etabliert. Es wurden drei unterschiedliche Mausstämme Wildtyp-, RAG1- sowie RORγt-KO-Mäusen eingeführt mit jeweils einer Kontrollgruppe mit Sham-operierten Mäusen und einer IRI-Gruppe, bei denen durch 60-minütiges Abklemmen der *A. mesenterica superior* eine warme Ischämie verursacht wurde.

Durch die Bestimmung des Chiu-Scores nach 15 Stunden Reperfusionszeit anhand der histologischen Auswertung eines Dünndarmabschnitts konnte die Wirksamkeit des angewandten Schädigungsmodells nachgewiesen werden.<sup>(44)</sup> Durch Chiu-Scoring von Jejunum und Ileum wurde im Vergleich ein signifikanter Unterschied im Ischämieausmaß, mit signifikant höherem Chiu-Score im Jejunum, festgestellt, was auf eine erhöhte Ischämietoleranz oder alternativen Gefäßversorgung als der AMS des Ileums hinweist. Mittels FACS-Analyse der isolierten Zellen aus der *Lamina Propria* wurde als Hauptquelle für IL-17A in den Wildtyp-Mäusen die *Lineage<sup>+</sup>* Th17-Zelle verantwortlich gemacht. Auch konnte hierdurch in Kombination mit den drei Mäusestämmen den ILC3s eine wichtige Rolle in der IL-17A wie auch IL-22 Produktion im IRI-Modell zugesprochen werden. Über den Einsatz der Wildtyp-, RAG1- und RORγt-KO-Mäusen war es möglich eine Korrelation zwischen erhöhten IL-17A-Spiegeln und höheren Chiu-Scores sowie einer möglichen reziproken

Beeinflussung von IL-22 auf den Ischämie-Reperfusionsschaden verdeutlicht werden. RAG1-Mäuse mit vermehrter IL-22 Produktion hatten niedrigere Chiu-Scores als Wildtyp-Mäuse, welche eine geringere IL-22 Produktion sowie weniger ILC3s hatten. Diesen Effekt kann man gut über eine protektive Wirkung von ILC3s-produziertem IL-22 erklären. Bei sehr geringen IL-17A und IL-22 Werten bei den RORyt-KO-Mäusen mit ähnlich niedrigem Chiu-Scoring kann dies möglicherweise auf die sehr niedrigen IL-17A Werte zurückgeführt werden. Womöglich lässt sich der Chiu-Score bei den RORyt-KO-Mäusen durch die dort erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion erklären.

Abschließend zeigen diese Erkenntnisse, dass es schwer ist eine spezifische Zellpopulation für die IL-17A Produktion verantwortlich zu machen, wie die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten vor Augen führen.<sup>(31,32)</sup> Dennoch erscheint die These der gewebeprotektiven Wirkung von IL-22 durch ILC3s im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens als vielversprechend. Wie IL-22 hierbei seine protektive Wirkung während der Ischämie entfaltet und inwiefern sich die Ergebnisse basierend auf einem Mausmodell der warmen Darmischämie auf den menschlichen Organismus übertragen lassen, bedarf weiterer Forschung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667–85. doi:10.1038/nri3738
2. Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(3):181–7. doi:10.1007/s00384-002-0444-1
3. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2011;32(6):256–64. doi:10.1016/j.it.2011.04.003
4. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799–809. doi:10.1038/nri2653
5. Kassahun WT, Schulz T, Richter O, Hauss J. Unchanged high mortality rates from acute occlusive intestinal ischemia: six year review. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393(2):163–71. doi:10.1007/s00423-007-0263-5
6. Lobo Martinez E, Merono Carvajosa E, Sacco O, Martinez Molina E. Embolectomy in mesenteric ischemia [Embolectomia en la isquemia mesenterica]. *Rev Esp Enferm Dig.* 1993;83(5):351–4. spa.
7. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391–401. doi:10.1038/nm.2507
8. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, Matthijsen RA, Bruïne AP de, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CHC, Buurman WA. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2283–91. doi:10.2353/ajpath.2010.091069
9. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, Zen F de, Prokai A, Zuchriegel G, Krombach F, Welz P-S, Weinlich R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Pasparakis M, Bleich M, Weinberg JM, Reichel CA, Bräsen JH, Kunzendorf U, Anders H-J, Stockwell BR, Green DR, Krautwald S. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(47):16836–41. doi:10.1073/pnas.1415518111
10. Satpute SR, Park JM, Jang HR, Agreda P, Liu M, Gandolfo MT, Racusen L, Rabb H. The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol.* 2009;183(2):984–92. doi:10.4049/jimmunol.0801928

11. McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(2):F189-201. doi:10.1152/ajprenal.00224.2003
12. Zuidema MY, Zhang C. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol*. 2010;2(10):325–32. doi:10.4330/wjc.v2.i10.325
13. Eckstein H-H. Acute mesenteric ischemia. Resection or reconstruction? [Die akute mesenteriale Ischämie. Resektion oder Rekonstruktion?]. *Chirurg*. 2003;74(5):419–31. ger. doi:10.1007/s00104-003-0630-x
14. Renner P, Kienle K, Dahlke MH, Heiss P, Pfister K, Stroszczynski C, Piso P, Schlitt HJ. Intestinal ischemia: current treatment concepts. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(1):3–11. doi:10.1007/s00423-010-0726-y
15. Dahlke MH, Asshoff L, Popp FC, Feuerbach S, Lang SA, Renner P, Slowik P, Stoeltzing O, Schlitt HJ, Piso P. Mesenteric ischemia--outcome after surgical therapy in 83 patients. *Dig Surg*. 2008;25(3):213–9. doi:10.1159/000140692
16. Gupta R, Chimpiri AR, Saucedo JF. Superior mesenteric artery thrombosis managed percutaneously by timely combining aspiration thrombectomy with angioplasty and stents. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;29(1):105–7. doi:10.1007/s11239-009-0349-8
17. Janeway C. Immunobiology: The immune system in health and disease / Charles A. Janeway, Jr. [et al.]. 6th ed. New York, London: Garland Science; 2005.
18. Pan H-F, Li X-P, Zheng SG, Ye D-Q. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(1):51–7. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.07.002
19. Eberl G. ROR $\gamma$ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):27–34. doi:10.1038/mi.2016.86
20. Sanos SL, Vonarbourg C, Mortha A, Diefenbach A. Control of epithelial cell function by interleukin-22-producing ROR $\gamma$ mat<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Immunology*. 2011;132(4):453–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03410.x
21. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008;223:87–113. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x
22. Castro G, Liu X, Ngo K, Leon-Tabaldo A de, Zhao S, Luna-Roman R, Yu J, Cao T, Kuhn R, Wilkinson P, Herman K, Nelen MI, Blevitt J, Xue X, Fourie A, Fung-

- Leung W-P. ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$  signature genes in human Th17 cells. PLoS ONE. 2017;12(8). doi:10.1371/journal.pone.0181868
23. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. Postepy Dermatol Alergol. 2014;31(4):256–61. doi:10.5114/pdia.2014.40954
24. Yamada H. Current perspectives on the role of IL-17 in autoimmune disease. J Inflamm Res. 2010;333–44.
25. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat Rev Immunol. 2010;10(7):479–89. doi:10.1038/nri2800
26. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med. 2006;203(10):2271–9. doi:10.1084/jem.20061308
27. Eggenhofer E, Rovira J, Sabet-Baktach M, Groell A, Scherer MN, Dahlke M-H, Farkas SA, Loss M, Koehl GE, Lang SA, Melter M, Schlitt HJ, Geissler EK, Kroemer A. Unconventional ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells drive hepatic ischemia reperfusion injury. J Immunol. 2013;191(1):480–7. doi:10.4049/jimmunol.1202975
28. Eggenhofer E, Sabet-Rashedi M, Lantow M, Renner P, Rovira J, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, Kroemer A. ROR $\gamma$ t(+) IL-22-producing NKp46(+) cells protect from hepatic ischemia reperfusion injury in mice. J Hepatol. 2016;64(1):128–34. doi:10.1016/j.jhep.2015.08.023
29. Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hosomura N, Amemiya H, Tsuchiya M, Hara M. Role of IL-17A in neutrophil recruitment and hepatic injury after warm ischemia-reperfusion mice. J Immunol. 2011;187(9):4818–25. doi:10.4049/jimmunol.1100490
30. Takahashi N, Vanlaere I, Rycke R de, Cauwels A, Joosten LAB, Lubberts E, van den Berg WB, Libert C. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. J Exp Med. 2008;205(8):1755–61. doi:10.1084/jem.20080588
31. Lee HT, Kim M, Kim JY, Brown KM, Ham A, D'Agati VD, Mori-Akiyama Y. Critical role of interleukin-17A in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013;304(1):G12-25. doi:10.1152/ajpgi.00201.2012

32. Geha M, Tsokos MG, Bosse RE, Sannikova T, Iwakura Y, Dalle Lucca JJ, Waal Malefyt R de, Tsokos GC. IL-17A Produced by Innate Lymphoid Cells Is Essential for Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol.* 2017;199(8):2921–9. doi:10.4049/jimmunol.1700655
33. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. IL-22, cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine.* 2015;74(1):35–42. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.007
34. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2008;118(2):534–44. doi:10.1172/JCI33194
35. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity.* 2008;29(6):947–57. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.003
36. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CAJ, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention J-J, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity.* 2008;29(6):958–70. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.001
37. Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood.* 2014;124(5):700–9. doi:10.1182/blood-2013-11-427781
38. Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2014;41(3):354–65. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.005
39. Rankin L, Groom J, Mielke LA, Seillet C, Belz GT. Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. *Front Immunol.* 2013;4:22. doi:10.3389/fimmu.2013.00022
40. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CGK, Grunberg S, Sinha R, Mantegazza AR, Ma H-L, Crawford A, Angelosanto JM, Wherry EJ, Koni PA, Bushman FD, Elson CO, Eberl G, Artis D, Sonnenberg GF. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature.* 2013;498(7452):113–7. doi:10.1038/nature12240



41. Konya V, Mjosberg J. Innate lymphoid cells in graft-versus-host disease. *Am J Transplant.* 2015;15(11):2795–801. doi:10.1111/ajt.13394
42. Visan I. Mucosal ILC diversity. *Nat Immunol.* 2013;14(7):691. doi:10.1038/ni.2658
43. Cook MJ. The anatomy of the laboratory mouse. London: Academic Press; 1980. 143 s.
44. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478–83.
45. Feinman R, Deitch EA, Watkins AC, Abungu B, Colorado I, Kannan KB, Sheth SU, Caputo FJ, Lu Q, Ramanathan M, Attan S, Badami CD, Doucet D, Barlos D, Bosch-Marce M, Semenza GL, Xu D-Z. HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(4):G833-43. doi:10.1152/ajpgi.00065.2010
46. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 1992;68(5):869–77. doi:10.1016/0092-8674(92)90030-G
47. Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC. Mouse Cell Surface Antigens: Nomenclature and Immunophenotyping. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1998;160(8):3861–8. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/160/8/3861.full.pdf>
48. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):75–87. doi:10.1038/nri3349
49. Gubernatorova EO, Perez-Chanona E, Koroleva EP, Jobin C, Tumanov AV. Murine Model of Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. *J Vis Exp.* 2016;(111). doi:10.3791/53881
50. Paulsen F, Sobotta J. Atlas der Anatomie des Menschen. 23rd ed. München: Elsevier, Urban et Fischer; 2013. 104 S.
51. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas Anatomie. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2015. 512 S.
52. Kaufman MH, Bard J. The anatomical basis of mouse development. San Diego, Calif. [u.a.]: Acad. Press; 2006. XII, 291 S.

53. Stott WT, Dryzga MD, Ramsey JC. Blood-flow distribution in the mouse. *J Appl Toxicol.* 1983;3(6):310–2.
54. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology.* 2011;53(5):1662–75. doi:10.1002/hep.24253
55. Rao J, Lu L, Zhai Y. T cells in organ ischemia reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014;19(2):115–20. doi:10.1097/MOT.0000000000000064
56. Tan Z, Jiang R, Wang X, Wang Y, Lu L, Liu Q, Zheng SG, Sun B, Ryffel B. ROR $\gamma$ t+IL-17+ neutrophils play a critical role in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Biol.* 2013;5(2):143–6. doi:10.1093/jmcb/mjs065
57. Klose CSN, Flach M, Mohle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Busslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* 2014;157(2):340–56. doi:10.1016/j.cell.2014.03.030
58. Gracz AD, Fuller MK, Wang F, Li L, Stelzner M, Dunn JCY, Martin MG, Magness ST. Brief report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells. *Stem Cells.* 2013;31(9):2024–30. doi:10.1002/stem.1391
59. Roth S, Franken P, Sacchetti A, Kremer A, Anderson K, Sansom O, Fodde R. Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e38965. doi:10.1371/journal.pone.0038965
60. Rao J, Lu L, Zhai Y. T cells in Organ Ischemia Reperfusion Injury. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014;19(2):115–20. doi:10.1097/MOT.0000000000000064
61. Tan Z, Jiang R, Wang X, Wang Y, Lu L, Liu Q, Zheng SG, Sun B, Ryffel B. ROR $\gamma$ t+IL-17+ neutrophils play a critical role in hepatic ischemia–reperfusion injury. *J Mol Cell Biol.* 2013;5(2):143–6. doi:10.1093/jmcb/mjs065
62. Li G-Z, Zhong D, Yang L-M, Sun B, Zhong Z-H, Yin Y-H, Cheng J, Yan B-B, Li H-L. Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol.* 2005;62(5):481–6. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01683.x

63. Jafarzadeh A, Esmaeeli-Nadimi A, Nough H, Nemati M, Rezayati MT. Serum levels of interleukin (IL)-13, IL-17 and IL-18 in patients with ischemic heart disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2009;9(2):75–83.
64. Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, Strieter RM, Rosin DL, Okusa MD. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2010;120(1):331–42. doi:10.1172/JCI38702
65. Xu M-J, Feng D, Wang H, Guan Y, Yan X, Gao B. IL-22 ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by targeting proximal tubule epithelium. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):967–77. doi:10.1681/ASN.2013060611
66. Beaurepaire C, Smyth D, McKay DM. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(3):133–44. doi:10.1089/jir.2008.0057
67. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity.* 2010;32(3):392–402. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.001
68. Schuhmann D, Godoy P, Weiss C, Gerloff A, Singer MV, Dooley S, Böcker U. Interfering with interferon- $\gamma$  signalling in intestinal epithelial cells: Selective inhibition of apoptosis-maintained secretion of anti-inflammatory interleukin-18 binding protein. *Clin Exp Immunol.* 2011;163(1):65–76. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04250.x
69. Scheiermann P, Bachmann M, Goren I, Zwissler B, Pfeilschifter J, Mühl H. Application of interleukin-22 mediates protection in experimental acetaminophen-induced acute liver injury. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1107–13. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.010
70. Mühl H, Scheiermann P, Bachmann M, Härdle L, Heinrichs A, Pfeilschifter J. IL-22 in tissue-protective therapy. *Br J Pharmacol.* 2013;169(4):761–71. doi:10.1111/bph.12196

### Danksagung

Nach 6 Jahren Studium blicke ich nun auf eine unbeschwerte Zeit in einem wunderbaren Studiengang zurück. Ich möchte mich hiermit von ganzem Herzen bei allen Menschen bedanken, die ein wichtiger Teil dieses Lebensabschnittes gewesen oder immer noch an meiner Seite sind!

An dieser Stelle möchte ich mich natürlich insbesondere bei all denen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit in jeglicher Weise unterstützt haben.

Ich kann mich gar nicht genug bei **PD Dr. rer. nat Elke Eggenhofer** für die beste Betreuung, die man sich nur vorstellen kann, bedanken. Die professionelle Unterstützung, Anleitung und ein offenes Ohr für alle Fragen sowie Sorgen waren und sind unbezahlbar. Vielen Dank dafür! Auch bedanke ich mich natürlich bei **Dr. Manije Sabet-Rashedi** für die Überlassung, tolle Einführung sowie Einarbeitung in das spannende Thema.

Selbstverständlich ist auch dem Laborteam der Arbeitsgruppe mit **Tatjana Liebeld, Lisa Flohr, Lydia Schneider** und **Manfred Haas** großer Dank geschuldet. Wenn die Arbeit sich nach Freizeit anfühlt und man beim konzentrierten Arbeiten trotzdem noch Spaß und Freude hat, weiß man, dass man in der richtigen Arbeitsgruppe gelandet ist. Ihr seid einfach alle toll! Danke für die eure Hilfe!

Auch meinen Freunden gilt hier mein besonderer Dank: **Johanna, Maxi, Matthias, Max, Max, Niko, Johannes** und den hier nicht genannten. Was wäre ein 6-jähriges Studium ohne gute Freunde an der Seite, die immer da sind, wenn man sie braucht. Sei es beim Sport oder ein fröhlicher Abend, es war mir immer wieder ein Fest!

Abschließend kann ich mich natürlich nicht genug bei meinen **Eltern** bedanken, welche sich schon immer für mich aufgeopfert haben und mir den Rücken freigehalten haben, um mir ein besseres Leben zu ermöglichen.

Con thương bố mẹ!

## Selbstständigkeitserklärung

Ich, Minh Quan Nguyen, geboren am 28.01.1994 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Pathomechanismus der IL-17/IL-22 Produktion im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschaden in einem Mausmodell der warmen Darmischämie“**

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

---

Minh Quan Nguyen